



WYDZIAŁ
BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA



Uniwersytet
ŁÓDZKI



UNIwersYTET ŁÓDZKI
WYDZIAŁ BIOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA
STACJONARNE STUDIA
DOKTORANCKIE BIOCHEMICZNO-BIOFIZYCZNE

PIOTR KAMIL ZAKRZEWSKI

**MOLEKULARNE PODŁOŻE ZABURZENIA EKSPRESJI
BETAGLIKANU W RAKU ENDOMETRIUM**

Molecular basis of betaglycan deregulation in endometrial cancer

PRACA DOKTORSKA

WYKONANA POD KIERUNKIEM

PROF. DR HAB. WANDY M. KRAJEWSKIEJ

W KATEDRZE CYTOBIOCHEMII UŁ

ŁÓDŹ 2016

PRACA DOKTORSKA REALIZOWANA W RAMACH PROJEKTÓW



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



**„DOKTORANCI – REGIONALNA INWESTYCJA W MŁODYCH NAUKOWCÓW –
AKRONIM D-RIM, II-EDYCJA” WSPÓŁFINANSOWANEGO PRZEZ UNIĘ
EUROPEJSKĄ ZE ŚRODKÓW FUNDUSZU SPOŁECZNEGO W RAMACH
PROGRAMU OPERACYJNEGO KAPITAŁ LUDZKI, PRIORYTET VIII,
PODDZIAŁANIE 8.2.1, „CZŁOWIEK NAJLEPSZA INWESTYCJA”**



NARODOWE CENTRUM NAUKI

**„MOLEKULARNE PODŁOŻE ZABURZENIA EKSPRESJI BETAGLIKANU W RAKU
ENDOMETRIUM” NR 2011/01/N/NZ4/01723 FINANSOWANEGO
ZE ŚRODKÓW NARODOWEGO CENTRUM NAUKI W LATACH 2011-2013**



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego



WYDZIAŁ
BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA

**FINANSOWANYCH W RAMACH DOTACJI NA DZIAŁALNOŚĆ POLEGAJĄCĄ
NA PROWADZENIU BADAŃ NAUKOWYCH LUB PRAC ROZWOJOWYCH ORAZ
ZADAŃ Z NIMI ZWIĄZANYCH SŁUŻĄCYCH ROZWOJOWI MŁODYCH
NAUKOWCÓW ORAZ UCZESTNIKÓW STUDIÓW DOKTORANCKICH W LATACH
2011-2013**

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi niniejszej rozprawy

prof. dr hab. Wandzie M. Krajewskiej

*za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki,
poświęcony czas, wyrozumiałość i cierpliwość.*

Dziękuję **Pracownikom, Doktorantom i Magistrantom**

Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego

za pomoc, życzliwość i przyjazną atmosferę pracy,

*a w szczególności **dr. Adamowi I. Cygankiewiczowi***

*oraz **dr Marii Nowackiej-Zawiszy***

za cenne rady, wsparcie i okazaną pomoc.

Specjalne podziękowania składam również

prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Semczukowi

z II Kliniki i Katedry Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

za udostępnianie materiału badawczego

oraz współpracę przy redagowaniu manuskryptów prac

dr Ewie Formie i prof. dr hab. Magdalenie Bryś

z Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego

za udostępniony materiał badawczy wykorzystany

w trakcie analizy zmian polimorficznych

oraz

Moim Najbliższym

za wiarę, motywację, wyrozumiałość i wszelką pomoc

Dziękuję

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów i symboli	iii
1. Wstęp 1	
1.1. Rak endometrium	1
1.1.1. Epidemiologia	1
1.1.2. Etiologia i czynniki ryzyka	4
1.1.3. Typy kliniczno-patologiczne	5
1.1.4. Klasyfikacja kliniczno-patologiczna	8
<i>Klasyfikacja histopatologiczna</i>	<i>8</i>
<i>Stopień histologicznej dojrzałości komórek nowotworowych</i>	<i>9</i>
<i>Ocena kliniczno-patologiczna według skali FIGO.....</i>	<i>9</i>
1.1.5. Heterogenność raka endometrium – dwa czy więcej typów klinicznych raka endometrium	10
1.2. Sygnalizacja komórkowa indukowana transformującymi czynnikami wzrostu typu β	12
1.2.1. Nadrodzina transformujących czynników wzrostu typu β	12
1.2.2. Kanoniczna sygnalizacja komórkowa indukowana czynnikami TGF β	14
1.2.3. Niekanoniczna sygnalizacja TGF β	19
1.2.4. Receptory pomocnicze kaskady TGF β	20
1.2.5. Betaglikan – struktura i funkcja	23
1.3. Udział szlaku sygnalizacyjnego TGF β w transformacji nowotworowej.....	29
1.3.1. Paradoks sygnalizacji TGF β w procesie nowotworzenia.....	29
1.3.2. Szlak TGF β jako supresor procesu nowotworzenia	30
<i>Efekt cytostatyczny</i>	<i>30</i>
<i>Indukcja apoptozy</i>	<i>31</i>
1.3.3. Szlak TGF β jako promotor progresji i przerzutowania nowotworów	34
<i>Supresja odpowiedzi immunologicznej</i>	<i>34</i>
<i>Sygnalizacja TGFβ a angiogeneza</i>	<i>39</i>
2. Cel pracy	43
3. Materiał	44
4. Metody	46
4.1. Izolacja RNA	46
4.2. Izolacja DNA	46
4.3. Spektrofotometryczna ocena jakościowa i ilościowa preparatów kwasów nukleinowych	47
4.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji	47
4.5. Analiza ilościowa przyrostu produktu łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR)	48
4.6. Otrzymywanie homogenatów tkankowych	49

4.7. Analiza ilościowa białka	49
4.8. Immunodetekcja białek techniką Western blot.....	50
4.9. Analiza metylacji DNA techniką metylospecyficznej reakcji łańcuchowej polimerazy (MSP-PCR).....	53
4.10. Analiza utraty heterozygotyczności na podstawie długości produktów reakcji PCR w automatycznym sekwenatorze DNA.....	58
4.11. Analiza polimorfizmów jednonukleotydowych z zastosowaniem sond fluorescencyjnych TaqMan®	60
4.12. Analiza statystyczna	62
5. Wyniki	64
5.1. Ocena ekspresji genu <i>TGFBR3</i> na poziomie mRNA	64
5.2. Ocena ekspresji betaglikanu na poziomie białka	67
5.3. Ocena metylacji regionu promotorowego genu <i>TGFBR3</i>	70
5.4. Ocena ekspresji na poziomie mRNA czynnika transkrypcyjnego <i>GATA3</i> regulującego ekspresję betaglikanu	75
5.5. Ocena metylacji regionu promotorowego genu <i>GATA3</i>	80
5.6. Analiza korelacji ekspresji oraz poziomu metylacji genów <i>TGFBR3</i> oraz <i>GATA3</i>	85
5.7. Ocena utraty heterozygotyczności w locus genu <i>TGFBR3</i>	87
5.8. Ocena polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu <i>TGFBR3</i>	90
5.8.1. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w regionie promotorowym genu <i>TGFBR3</i>	91
5.8.2. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w regionie kodującym genu <i>TGFBR3</i>	97
5.8.3. Analiza rozkładu kombinacji genotypów miejsc polimorficznych genu <i>TGFBR3</i>	108
5.8.4. Analiza rozkładu kombinacji haplotypów miejsc polimorficznych genu <i>TGFBR3</i>	109
5.8.5. Analiza rozkładu częstości alleli badanych miejsc polimorficznych genu <i>TGFBR3</i> w grupie kontrolnej w porównaniu z populacją europejską	110
6. Dyskusja	111
7. Podsumowanie wyników	132
8. Wnioski	133
9. Streszczenie	134
10. Abstract	137
11. Literatura	140

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

ActRII, ActRIIB – ang. *activin receptor type II, IIB* – receptory typu II dla ACTs i INHs

ACTs – ang. *actvins* – aktywiny, białka należące do nadrodziny czynników TGFβ

ADAM19 – ang. *a disintegrin and metalloproteinase 19* – zakotwiczone w błonie komórkowej białko należące do rodziny proteaz zawierających w strukturze domeny charakterystyczne dla dezintegryn oraz metaloproteinaz

Akt – ang. *mouse bred Ak+thymoma* – kinaza efektorowa szlaku sygnalizacyjnego PI3K/Akt

ALK1-7 – ang. *activin receptor like-kinases* – kinazy receptorowe TGFβ, receptory TGFβ typu I

AMCOM – ang. *α2-macroglobulin/complement gene family* – rodzina genów kodujących α2-makroglobulinę oraz składowe układu dopełniacza

ANGPTL4 – ang. *angiopoietin-like protein 4* – czynnik 4 podobny do angiopoetyny

AP1 – ang. *activator protein 1* – kompleks białkowy o funkcji czynnika transkrypcyjnego

ARG1 – ang. *arginase 1* – arginaza 1

ASR – ang. *age-standardised incidence rate* – standaryzowany względem wieku współczynnik zachorowalności

ATF3 – ang. *activating transcription factor 3* – czynnik transkrypcyjny należący do rodziny CREB zależnej od cyklicznego AMP

βAR-2 – ang. *β-arrestin-2* – β arestyna 2

Bcl-2 – ang. *apoptosis regulator B-cell lymphoma 2 family* – prototypowe białko antyapoptotyczne rodziny Bcl-2 zidentyfikowane w komórkach białaczki wywodzącej się z komórek typu B

Bcl-xL – ang. *B-cell lymphoma-extra large* – białko antyapoptotyczne należące do rodziny Bcl-2

bFGF – ang. *basic fibroblast growth factor* – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (inaczej FGF2)

Bim – ang. *Bcl-2 interacting mediator of cell death* – białko proapoptotyczne należące do rodziny Bcl-2

Bmf – ang. *Bcl-2 modifying factor* – białko proapoptotyczne należące do rodziny Bcl-2

BMPRII – ang. *bone morphogenetic protein receptor type II* – receptory TGFβ typu II dla BMP

BMPs – ang. *bone morphogenetic proteins* – białka morfogenetyczne kości należące do nadrodziny czynników TGFβ

BRAF – ang. *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B* – protoonkogen kodujący kinazę serynowo/treoninową z rodziny RAF zidentyfikowany w wirusie mięsaka myszy

BRCA1 – ang. *breast cancer 1* – gen kodujący białko supresorowe BRCA1 zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA

BRE – ang. *BMP-response element* – sekwencja nukleotydowa rozpoznawana przez kompleksy transkrypcyjne zależne od BMP

C/EBPβ – ang. *CCAAT-enhancer-binding proteins β* – białka należące do rodziny czynników transkrypcyjnych rozpoznających sekwencję regulatorową CCAAT

CA125, CA19-9 – ang. *cancer antigen 125, 19-9* – antygeny nowotworowe 125, 19-9

CD105 – ang. *cluster of differentiation 105* – antygen powierzchniowy 105 – endogлина o funkcji receptora pomocniczego szlaku TGFβ

CD109 – *ang. cluster of differentiation 109* – antygen powierzchniowy 109 należący do rodziny białek AMCOM o funkcji receptora pomocniczego szlaku TGFβ

Cdc25 – *ang. cell division cycle protein 25* – fosfataza zaangażowana w regulację cyklu komórkowego

Cdc42EP3 – *ang. Cdc42 effector protein 3* – białko o funkcji negatywnego regulatora białka Cdc42 (*ang. cell division cycle protein 42*), zaangażowanego w regulację punktów kontrolnych cyklu komórkowego

Cdks – *ang. cyclin-dependent kinases* – kinazy zależne od cyklin regulujące cykl komórkowy

c-Jun – *jap. ju-nana* – białko kodowane przez porotoonkogen *JUN* będący homologiem onkogenu zidentyfikowanego w wirusie mięsaka ptaków ASV17

CK – *ang. cysteine knot* – węzeł cysteinowy – motyw strukturalny bogaty w reszty cysteiny

c-Myc – *ang. myelocytomatosis viral oncogene homolog* – białko kodowane przez protoonkogen *MYC* będący homologiem wirusowego onkogenu zidentyfikowanego w wirusie białaczki ptaków

Col VI-A1 – *ang. collagen type VI alpha 1* – łańcuch α kolagenu typu VI

Co-Smad – *ang. common-mediators Smad* – pośredniczące białko efektorowe szlaku TGFβ, białko Smad4

COUP-TFII – *ang. chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor 2* – czynnik transkrypcyjny rozpoznający sekwencję nukleotydową zidentyfikowaną w promotorze genu kodującego albuminę jaja kurzego

CREB/ATF – *ang. cAMP response element binding protein/activating transcription factors* – rodzina czynników transkrypcyjnych zależnych od cAMP

CRIPTO – produkt białkowy genu *CFC1B* należący do rodziny Cripto o funkcji receptora pomocniczego szlaku TGFβ

CTGF – *ang. connective tissue growth factor* – czynnik wzrostu tkanki łącznej

CTNNB1 – *ang. catenin beta-1* – gen kodujący β-kateninę

CXCL1 – *ang. C-X-C motif ligand 1* – chemokina 1 zawierająca w swej strukturze motyw C-X-C

DAPK – *ang. death associated protein kinase* – kinaza białkowa związana ze śmiercią komórkową indukowaną INF-γ

DAXX – *ang. death-associated protein* – białko adaptorowe śmierci komórkowej

DCs – *ang. dendritic cells* – komórki dendrytyczne

E – *ang. endoglin-related domain* – domena występująca w betaglikanie o wysokim stopniu homologii do endogliny

E2F – rodzina czynników transkrypcyjnych występujących w organizmach eukariotycznych (aktywatory transkrypcji: E2F1/2/3a; represory transkrypcji: E2F3b, E2F4-8)

ECM – *ang. extracellular matrix* – macierz zewnątrzkomórkowa

EGF – *ang. epidermal growth factor* – naskórkowy czynnik wzrostu

EHP – *ang. external hydrophobic patch* – sekwencja zlokalizowana na C-końcu domeny ZP betaglikanu

EIC – *ang. endometrial in situ carcinoma* – rak endometrium *in situ*

EIN – *ang. endometrial intraepithelial neoplasia* – neoplazja wewnątrznabłonkowa endometrium uznawana za zmianę przednowotworową

EMT – ang. *epithelial-mesenchymal transition* – przemiana nabłonkowo-mezenchymalna

Eph – ang. *ephrins* – efryny, ligandy dla receptorowych kinaz tyrozynowych

EphB2 – ang. *ephrin type-B receptor 2* – receptor 2 typu B dla efryn

ER – ang. *estrogen receptor* – receptory estrogenów

ErbB4 – ang. *erythroblastosis B4* – receptor błonowy o aktywności kinazy tyrozynowej rodziny ErbB

ERBIN – ang. *ErbB2-interacting protein* – białko oddziałujące z receptorową kinazą tyrozynową ErbB2

ERK1/2 – ang. *extracellular signal-regulated kinases 1/2* – kinazy rodziny MAPK regulowane przez sygnał zewnątrzkomórkowy

Ets-2 – ang. *E twenty six homolog 2* – czynnik transkrypcyjny kodowany przez protoonkogen *ETS2* będący homologiem onkogenu zidentyfikowanego w wirusie erytroblastozy ptaków, szczep E26

Evi-1 – ang. *ecotropic virus integration site 1 protein homolog* – czynnik transkrypcyjny kodowany przez protoonkogen *EVI1* zawierający strukturę palców cynkowych

FasL – ang. *Fas ligand* – ligand receptora śmierci FasR

FasR – ang. *TNF receptor superfamily, member 6* – receptor śmierci, powierzchniowy receptor 6 należący do nadrodziny receptorów dla czynnika martwicy guzów TNF

FKBP12 – ang. *FK506 binding protein- immunophilin 12-kd* – białko należące do rodziny immunofilin o aktywności *cis-trans* izomerazy peptydylo-prolilowej, wiążące lek immunosupresyjny FK506 (takrolimus)

FOX – ang. *forkhead box* – rodzina czynników transkrypcyjnych posiadająca motyw „FOX” odpowiedzialny za rozpoznawanie i wiązanie DNA

G – ang. *grading* – stopień dojrzałości histologicznej komórek nowotworowych (zróżnicowania komórek/złośliwości nowotworu)

G3EC – ang. *G3 endometrioid carcinoma* – rak endometrium typu I o stopniu złośliwości histologicznej komórek nowotworowych G3

GADD45 α/β – ang. *growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 α/β* – białka modulujące odpowiedź komórkową na czynniki genotoksyczne

GAG – ang. *glycosaminoglycan* – glikozaminoglikan

GAIP – ang. *G alpha interacting protein* – białko oddziałujące z podjednostką α białka G

GATA3 – ang. *trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA3* – czynnik transkrypcyjny należący do rodziny GATA rozpoznający sekwencję nukleotydową 5' (A/T) GATA (A/G) 3'

GDFs – ang. *growth and differentiation factors* – czynniki wzrostu i różnicowania należące do nadrodziny czynników TGF β

GNDFs – ang. *glial cell-derived neurotrophic factors* – czynniki neurotroficzne pochodzące z komórek glejowych zaliczane do nadrodziny czynników TGF β

GEF114 – ang. *guanine nucleotide exchange factor 114* – białko zaangażowane w wymianę GDP→GTP aktywujące małe białka G

GIPI – ang. *GAIP-interacting protein, C terminus* – białko adaptorowe zaangażowane w endocytozę

GLUT1,8 – ang. *glucose transporter 1,8* – transportery glukozy 1,8

GPCR – ang. *G-protein coupled receptors* – siedmiotransmembranowe receptory oddziałujące z białkami G

GPI – ang. *glycosylphosphatidylinositol* – glikozylofosfatydyloinozytol

GP ER – ang. *G-protein coupled estrogen receptor* – receptor dla estrogenów oddziałujący z białkami G

GRKs – ang. *G protein-coupled receptor kinases* – kinazy receptorów oddziałujących z białkami G

GS – ang. *GS region* – region bogaty w reszty aa glicyny oraz seryny (TTSGSGSG) występujący w receptorach TGFβ typu I

HBV – ang. *hepatitis B virus* – wirus zapalenia wątroby typu B

HDR – ang. *hypoparathyroidism, sensoneurial deafness and renal disease* – zespół chorobowy obejmujący niedoczynność przysadczycy, czuciowo-nerwową utratę słuchu oraz dysfunkcję nerek

Her-2/neu – ang. *human epidermal growth factor receptor 2/neural tumor* – receptor naskórkowego czynnika wzrostu 2 zidentyfikowany w komórkach glejaka

HEY1,2 – geny docelowe sygnalizacji NOTCH

HIF-1 – ang. *hypoxia inducible factor-1* – czynnik transkrypcyjny 1 indukowany hipoksją

HIPK2 – ang. *homeodomain-interacting protein kinase 2* – kinaza serynowo/treoninowa oddziałująca z czynnikami transkrypcyjnymi rozpoznającymi sekwencje homeotyczne

HMG A2 – ang. *high-mobility group AT-hook 2* – białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej należące do czynników remodelujących strukturę chromatyny

hMLH1 – ang. *human MutL homolog 1* – ludzki homolog białka MutL zidentyfikowany w komórkach *E. coli*, biorący udział w naprawie błędnie sparowanych zasad DNA

hMSH2 – ang. *human MutS homolog 2* – ludzki homolog białka MutS zidentyfikowany w komórkach *E. coli*, biorący udział w naprawie błędnie sparowanych zasad DNA

HNPCC – ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer* – dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z popilpowatością

HOX – ang. *homeodomain box* – rodzina czynników transkrypcyjnych zawierających homeodomenę

HPK1 – ang. *hematopoietic progenitor kinase 1* – hematopoetyczna progenitorowa kinaza 1

HR – ang. *hazard ratio* – współczynnik hazardu

IAP-3 – ang. *inhibitor of apoptosis protein 3* – produkt białkowy genu *XIAP* należący do rodziny inhibitorów apoptozy

Id1,2,3 – ang. *inhibitor of DNA-binding 1,2,3* – białka hamujące wiązanie się do DNA czynników transkrypcyjnych należących do rodziny bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*)

IER3 – ang. *immediate early response 3* – białko 3 natychmiastowej odpowiedzi wczesnej

Igλ – ang. *immunoglobulin light chain λ* – łańcuchy lekkie *lambda* immunoglobulin

IL – ang. *interleukin* – interleukina

IL1RL1 – ang. *interleukin 1 receptor-like 1* – receptor 1 podobny do receptora interleukiny 1

INF-γ – ang. *interferon γ* – interferon gamma

INHs – ang. *inhibins* – inhibiny, białka należące do nadrodziny czynników TGFβ

I-Smad – ang. *inhibitory Smad* – inhibitorowe białka hamujące szlak TGFβ, białka Smad6/7

IκB – ang. *inhibitor of kappa B* – białko inhibitorowe czynnika transkrypcyjnego NFκB

JAGGED1 – gen docelowy sygnalizacji NOTCH

JAK/STAT – ang. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription* – szlak sygnalizacyjny kinazy Janus (JAK) oraz czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT (przełączniki sygnału i aktywatory transkrypcji)

JNK – ang. *c-Jun N-terminal kinase* – kinaza rodziny MAPK fosforylująca N-koniec białka c-Jun

JunB – ang. *transcription factor jun-B* – czynnik transkrypcyjny będący produktem białkowym protoonkogenu *JUNB*

Ki-67 – ang. *Kiel/Kilonia-67* – marker proliferacji komórkowej zidentyfikowany za pomocą przeciwciał monoklonalnych Ki-67

KRAS – ang. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* – protoonkogen, którego produkt białkowy należy do rodziny małych białek G

LAP – ang. *latency-associated peptide* – 249 aminokwasowy fragment probiałka TGFβ

LDLR – ang. *low-density lipoprotein receptor* – receptor lipoprotein o małej gęstości

LEMD3 – ang. *LEM domain-containing protein 3* – białko wewnętrznej błony otoczki jądrowej (INM, ang. *inner nuclear membrane*) zawierające domenę LEM, odpowiedzialne za hamowanie kanonicznej sygnalizacji TGFβ na skutek gromadzenia białek R-Smad w INM

LLC – ang. *large latent TGFβ complex* – duży kompleks latentny TGFβ powstający w wyniku wiązania SLC przez białko LTBP

LOH – ang. *loss of heterozygosity* – utrata heterozygotyczności

LTBP – ang. *latent TGFβ binding protein* – białko wiążące kompleks SLC i tworzące z nim kompleks LLC, odpowiedzialne za stabilizację oraz czasową inaktywację dimerów TGFβ

MAPK – ang. *mitogen-activated protein kinases* – kinazy białkowe aktywowane mitogenami

MAPKK – ang. *mitogen-activated protein kinase kinase* – kinaza MAPK (inaczej MKK/MAP2K)

MAPKKK – ang. *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* – kinaza kinazy MAPK (inaczej MKKK/MAP3K)

MCS – ang. *maturation cleavage site* – miejsce proteolitycznego cięcia w domenie ZP odpowiedzialne za uwalnianie fragmentów zewnątrzkomórkowych białek należących do rodziny ZP

MEK4 – ang. *MAPK/ERK kinase 4* – kinaza MAPK regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe należąca do rodziny MAPKK (inaczej MKK)

Mf – ang. *macrophage* – makrofag

MH1 – ang. *mad-homology domain 1* – domena charakterystyczna dla białek Co-Smad oraz R-Smad odpowiedzialna za wiązanie się z DNA, homologiczna z białkami Mad (ang. *mother against to decapentaplegic*) *Drosophila melanogaster*

MIS/AMH – ang. *Müllerian-inhibiting substance/anti-Müllerian hormone* – inhibitor Müllerianiego/hormon anty-mülleryczny, czynnik hamujący rozwój przewodów Müllera

MISRII/AMHRII – ang. *Müllerian-inhibiting substance receptor type II/anti-Müllerian hormone receptor type II* – receptor TGFβ typu II specyficzny względem czynnika MIS/AMH

Miz-1 – ang. *Myc-interacting zinc-finger protein 1* – białko oddziałujące z białkiem c-Myc

MKK4/7 – ang. *MAPK kinase 4/7* – kinaza MAPK (inaczej MAPKK)

MMP1, 9 – ang. *matrix metalloproteinase 1, 9* – metaloproteiny 1, 9 macierzy zewnątrzkomórkowej

MN1 – ang. *meningioma 1* – produkt białkowy genu *MN1* pełniący funkcję koregulatora transkrypcji, inaktywowany na skutek translokacji zrównoważonej w oponiaku

MRG1 (Meis2) – produkt białkowy genu *MEIS2* o funkcji czynnika transkrypcyjnego

MSI – ang. *microsatellite instability* – niestabilność mikrosatelitarna

MSP-PCR – ang. *methylospecific polymerase chain reaction* – metylospecyficzna reakcja łańcuchowa polimerazy

MT1, 3-MMP – ang. *membrane-type 1, 3 matrix metalloproteinases* – metaloproteiny macierzy typu błonowego 1, 3 określane symbolami MMP14 oraz MMP16

mTOR – ang. *mammalian target of rapamycin* – kinaza serynowo/treoninowa hamowana rapamycyną

Nf – ang. *neutrophil* – neutrofil

NFκB – ang. *nuclear factor kappa B* – czynnik jądrowy *kappa B*

NICD – ang. *notch intracellular domain* – domena wewnątrzkomórkowa białka Notch

NK – ang. *natural killers* – naturalne komórki zabijające

NKG2D – ang. *natural-killer group 2, member D* – receptor powierzchniowy komórek NK o funkcji aktywatora

NLS – ang. *nuclear localization sequence* – sekwencja lokalizacji jądrowej

NSCLC – ang. *non-small cell lung carcinoma* – niedrobnokomórkowy rak płuc

OR – ang. *odds ratio* – iloraz szans

OVOL1 – ang. *ovo-like zinc finger 1* – czynnik transkrypcyjny zawierający strukturę palców cynkowych, homologiczny z czynnikiem OVO *Drosophila melanogaster*

p15^{Ink4b} – ang. *protein 15 kDa cyclin-dependent kinase 4 inhibitor b* – inhibitor kinazy Cdk4 o m.cz. 15 kDa

p16^{Ink4a} – ang. *protein 16 kDa cyclin-dependent kinase 4 inhibitor a* – inhibitor kinazy Cdk4 o m. cz. 16 kDa

p21^{Cip1} – ang. *protein 21 kDa cdk-interacting protein 1* – inhibitor kinaz Cdk o m.cz. 21 kDa

p27^{Kip1}/CDKN1B – ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* – inhibitor kinaz Cdk o m. cz. 27 kDa

p38 – ang. *protein 38 kDa* – kinaza MAPK aktywowana mitogenami o m.cz. 38 kDa

p57^{Kip2}/CDKN1C – ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C* – inhibitor kinaz Cdk o m. cz. 57 kDa

p70^{S6K} – ang. *protein 70 kDa ribosomal protein S6 kinase* – kinaza efektorowa szlaku PI3K/Akt o m.cz. 70 kDa, której substratem jest rybosomalne białko S6

PAI-1 – ang. *plasminogen activator inhibitor type 1* – inhibitor 1 aktywatora plazminogenu

Par-4 – ang. *prostate apoptosis response-4* – białko supresorowe indukujące odpowiedź apoptotyczną w komórkach raka prostaty

PCR – ang. *polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy

PDGF – ang. *platelet-derived growth factor* – czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego

PGE-R4 – ang. *prostaglandin E – receptor 4* – receptor 4 prostaglandyny E

PI3K/Akt – ang. *phosphatidylinositol-3-kinase/mouse bred Ak+thymoma* – szlak sygnalizacyjny 3-kinazy fosfatydylinozytolu i kinazy Akt

Pim1 – ang. *proviral integration of Moloney virus-1* – protoonkogen należący do rodziny PIM o aktywności kinazy serynowo/treoninowej

POF – ang. *premature ovarian failure* – zespół przedwczesnego wygaszania funkcji jajników

PP2A – ang. *protein phosphatase 2A* – fosfataza białkowa 2A

PR – ang. *progesteron receptor* – receptor progesteronu

PTEN – ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten* – homolog fosfatazy i tensyny kodowany przez gen supresorowy *PTEN* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10q o podwójnej lipidowo-białkowej aktywności fosfatazowej

Real-time PCR – ang. *real-time polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

RGMa,b,c – ang. *repulsive guidance molecule a,b,c* – białka pełniące funkcję receptorów pomocniczych szlaku TGFβ

Rho – ang. *Ras homologous* – rodzina małych białek G o aktywności GTPazowej homologicznych z białkiem Ras (ang. *rat sarcoma*) zidentyfikowany w mięsaku szczurów

RORyt – ang. *retinoic-acid-receptor-related orphan receptor-γt* – receptor jądrowy RORyt

ROS – ang. *reactive oxygen species* – reaktywne formy tlenu

R-Smad – ang. *receptor-activated Smad* – receptorowe białka będące substratami dla domeny kinazowej receptorów TGFβ, Smad1,2,3,5,8

RT-PCR – ang. *reverse transcriptase PCR* – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą

RUNX – ang. *runt-related transcription factor box* – czynniki transkrypcyjne należące do rodziny Runt

SARA – ang. *SMAD anchor for receptor activation* – białko kotwiczące kompleks Smad2/3 i ułatwiające jego aktywację przez receptor TGFβ typu I

SBE – ang. *Smad-binding element* – sekwencja nukleotydowa CAGACA rozpoznawana przez kompleks białek R-Smad/Co-Smad

SDS-PAGE – ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecylosodowego

SGK1 – ang. *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1* – kinaza serynowo/treoninowa 1 regulowana przez surowicę i glukokortykosterydy

SLC – ang. *small latent complex* – mały kompleks latentny składający się z pro-TGFβ związanego niekowalencyjnie z fragmentem LAP

Smad – ang. *similar to mother against + mother against to decapentaplegic* – cytoplazmatyczne białka efektorowe szlaku TGFβ

Smurf1,2 – ang. *Smad ubiquitin regulatory factors 1,2* – białka o aktywności ligazy ubikwityny odpowiedzialne za proteasomalną degradację kompleksu receptorowego TGFβ/Smad7

Snail1/2 – czynniki transkrypcyjne o strukturze palców cynkowych kodowane przez geny *SNAIL1* i *SNAIL2* zaangażowane w przemianę nabłonkowo-mezenchymalną

SnoN – ang. *Ski-related novel gene isoform N* – onkoproteina należąca do rodziny SKI (ang. *Sloan-Kettering Institute*)

SNP – *ang. single nucleotide polymorphism* – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

sol-BG – *ang. soluble betaglycan* – rozpuszczalna forma betaglikanu powstająca w wyniku proteolitycznego uwalniania jego domeny zewnątrzkomórkowej

SP – *ang. signal peptide* – peptyd sygnałowy

SP1 – *ang. specific protein 1* – czynnik transkrypcyjny oddziałujący z sekwencjami bogatymi w pary GC

TAB1/2/3 – *ang. TAK1-binding protein 1/2/3* – białka wiążące kinazę TAK1

TAK1 – *ang. transforming growth factor β -activated kinase 1* – kinaza 1 aktywowana TGF β

TAM – *ang. tumor-associated macrophages* – makrofagi związane z guzem

T-box3 – czynnik transkrypcyjny kodowany przez gen *TBX3*

TGF β – *ang. transforming growth factors β type superfamily* – nadrodzina transformujących czynników wzrostu typu β

TGF β RI – *ang. TGF β receptor type I* – receptory typu I nadrodziny czynników TGF β

TGF β RII – *ang. TGF β receptor type II* – receptory typu II nadrodziny czynników TGF β

TGF β RI – *ang. TGF β receptor 1* – receptor typu I dla czynników TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 (inaczej ALK5)

TGF β RII – *ang. TGF β receptor 2* – receptor typu II dla czynników TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3

Th1,17 – *ang. T helper cells 1,17* – limfocyty pomocnicze

THBS1 – *ang. thrombospondin 1* – trombospondyna 1

TIE – *ang. TGF β inhibitory element* – sekwencja nukleotydowa rozpoznawana przez kompleksy białek Smad

TIMP – *ang. tissue inhibitor of metalloproteases* – tkankowy inhibitor metaloproteaz

TLR – *ang. toll-like receptor* – receptor toll-podobny

TNFRSF – *ang. tumor necrosis factor receptor superfamily* – nadrodzina receptorów błonowych TNF

TNF- α – *ang. tumor necrosis factor α* – czynnik martwicy guzów alfa

TP53 – *ang. tumor protein 53* – gen supresorowy kodujący białko p53 o funkcji czynnika transkrypcyjnego

TRAF6 – *ang. TNF receptor associated factor 6* – białkowy czynnik 6 wiążący się receptorami TNF

Treg – *ang. regulatory T cell* – regulatorowe limfocyty T

TRIP-Br2 – *ang. transcriptional regulator interacting with the PHS-bromodomain 2 protein* – regulator transkrypcji

TrkB/NTRK2 – *ang. tropomyosin related kinase B/tyrosine receptor kinase B/neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2* – receptorowa kinaza tyrozynowa B wiążąca neurotroficzne czynniki wzrostu

Twist – czynniki transkrypcyjne należące do rodziny bHLH (*ang. basic helix-loop-helix*)

uPa – *ang. urokinase-type plasminogen activator* – urokinazowy aktywator plazminogenu

VDR – *ang. vitamin D receptor* – receptor witaminy D

VEGF – *ang. vascular endothelial growth factor* – czynnik wzrostu śródbłónka naczyńniowego

WHO – *ang. World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia

WNT/ β -katenina – *ang. wingless+integration/ β -catenin* – szlak sygnalizacyjny WNT/ β -katenina

ZEB-1/2 – *ang. zinc finger E-box-binding homeobox 1/2* – czynniki transkrypcyjne o strukturze palców cynkowych

1. Wstęp

1.1. Rak endometrium

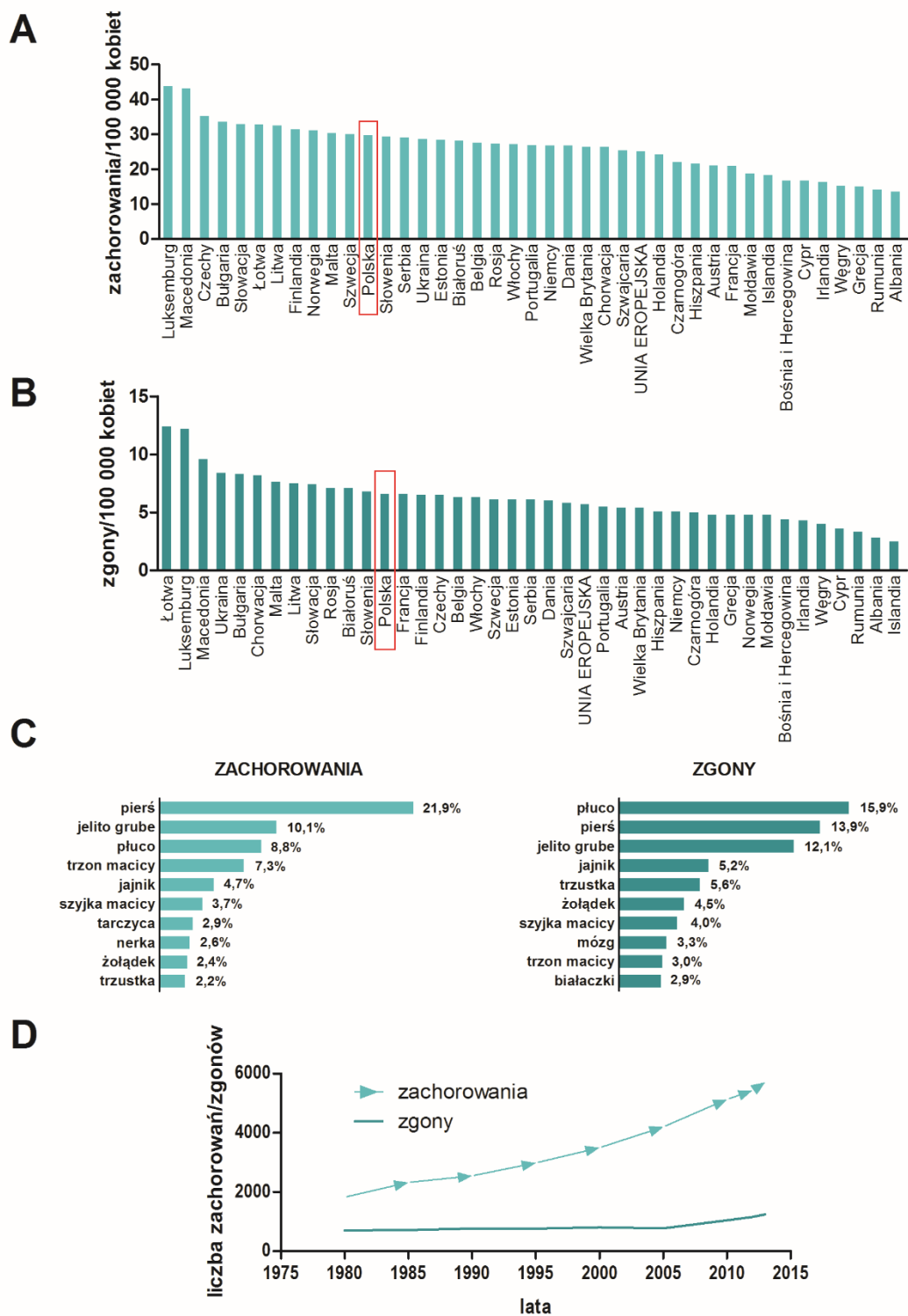
1.1.1. Epidemiologia

Rak endometrium – rak błony śluzowej trzonu macicy należy do jednych z najczęściej diagnozowanych ginekologicznych nowotworów złośliwych u kobiet. W 2012 roku liczba zachorowań na świecie na nowotwory trzonu macicy, wśród których rak endometrium stanowi ponad 80%, zgodnie z danymi GLOBOCAN 2012 (<http://globocan.iarc.fr>; dostęp z dnia 10/10/2016) wyniosła 319 605 przypadków, podczas gdy śmiertelność 76 160 przypadków, co stanowiło odpowiednio 4,8% oraz 2,1% wszystkich zachorowań/zgonów związanych z chorobami nowotworowymi. Cechą wyróżniającą nowotwory trzonu macicy jest znacznie wyższy odsetek występowania w krajach wysoko i średnio rozwiniętych. Spośród państw europejskich najwyższą zachorowalność, wyrażoną za pomocą „surowego” współczynnika zachorowalności (*ang. crude incidence rate*), tj. liczby zachorowań na 100 000 badanej populacji, obserwuje się w Luksemburgu (43,8), a najniższą w Albanii (13,5). Dla Polski współczynnik ten wynosi 29,8. Pod względem liczby zgonów najwyższy współczynnik umieralności notuje się na Łotwie (12,4), a najniższy w Islandii (2,5), natomiast w populacji polskiej jest on na poziomie 6,6. Statystyki dotyczące występowania nowotworów trzonu macicy wśród populacji polskiej w odniesieniu do krajów Unii Europejskiej są nieznacznie podwyższone, zarówno pod względem zachorowalności, jak i umieralności. Odpowiednio współczynniki zachorowalności/umieralności w przypadku Unii Europejskiej wynoszą 25,1 oraz 5,7 (**Ryc. 1.1 A-B.**) (Bray i wsp., 2013; Ferlay i wsp., 2014; Ferlay i wsp., 2015).

W Polsce zapadalność na nowotwory trzonu macicy zajmuje czwartą pozycję wśród chorób nowotworowych u kobiet, stanowiąc 7,3% wszystkich przypadków nowotworów, co przekłada się na 3% zgonów (**Ryc. 1.1 C.**). Podobnie jak w populacji światowej, także i w Polsce obserwuje się zwiększony odsetek zachorowań na ten typ nowotworu u kobiet w wieku około- i pomenopauzalnym. Ponad 90% zachorowań na nowotwory trzonu macicy występuje w grupie kobiet po 50 roku życia, a najwyższą zachorowalność notuje się między szóstą a siódmą

dekadą życia. Ryzyko zachorowania na raka trzonu macicy wykazuje tendencję rosnącą wraz z wiekiem aż do końca siódmej dekady życia, a następnie maleje. Rozpatrując liczbę zgonów spowodowanych nowotworami trzonu macicy, ponad 98% zgonów dotyczy kobiet po 50 roku życia, a najwyższy odsetek zgonów występuje w siódmej i ósmej dekadzie życia. Wskaźnik liczby zgonów do liczby zachorowań na przykładzie danych z 2013 roku wynosił 0,2 (Didkowska i Wojciechowska, 2015). W Polsce wskaźnik 5-letnich przeżyć pacjentek ze zdiagnozowanym w latach 2000-2002 rakiem trzonu macicy wyniósł 71,9%, przy średniej wieku pacjentek równej 62 lata, powodując skrócenie oczekiwanego czasu życia o 15,2% (Wojciechowska i wsp., 2009). Zgodnie z danymi Krajowego Rejestru Nowotworów przy Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie (<http://onkologia.org.pl/k/epidemiologia>; dostęp z dnia 10/10/2016) w ciągu ostatnich trzech dekad nastąpił wyraźny, prawie dwukrotny wzrost liczby zachorowań na raka trzonu macicy z 1827 przypadków w roku 1980 do 5706 w roku 2013, co odpowiadało wzrostowi standaryzowanego względem wieku współczynnika zachorowalności z 7,9 do poziomu 15,6 (**Ryc. 1.1 D.**). Obserwowany wzrost tempa zapadalności dotyczy kobiet w średnim (45-64 lat) oraz dojrzałym wieku (powyżej 65 lat), przy niezmiennym, stałym poziomie w grupie kobiet młodych (20-44 lat). Na przestrzeni minionych trzech dekad nieznaczemu obniżeniu uległ natomiast wskaźnik umieralności, jednak w znacznej mierze tendencja malejąca dotyczy tylko grupy kobiet w średnim wieku (45-64 lat). Śmiertelność wśród kobiet dojrzałych (powyżej 65 lat) utrzymuje się na dość wyrównanym poziomie.

Wzrost zachorowalności w grupie kobiet powyżej 45 roku życia, jest przede wszystkim efektem postępującego starzenia się populacji polskiej. Zgodnie z prognozami Głównego Urzędu Statystycznego na lata 2014-2050 (<http://stat.gov.pl>), pomimo spadku ogólnej liczby ludności w Polsce o prawie 4,55 mln (12%), do roku 2050 znacząco wzrośnie, tj. o 195,6% w porównaniu do stanu z 2013 roku, udział w strukturze społecznej ludzi powyżej 65 roku życia. Tym samym odsetek osób w tej grupie wiekowej zwiększy się w populacji polskiej z 14,7% do 32,7%. Jednocześnie, wydłużeniu ulegnie oczekiwana długość życia, która w przypadku kobiet wzrośnie o 6,4 lat, wynosząc 87,5 lat w 2050 roku (Waligórska i wsp., 2014).



Rycina 1.1. A) Zachorowania na nowotwory trzonu macicy w państwach europejskich. B) Zgony na nowotwory trzonu macicy w państwach europejskich. C) Struktura zachorowań/zgonów na choroby nowotworowe w Polsce wśród kobiet w 2013 roku. D) Liczba zachorowań/zgonów na nowotwory trzonu macicy w Polsce w latach 1980-2013. (<http://globocan.iarc.fr>; Didkowska i Wojciechowska, 2015)

Potwierdzenie pesymistycznych prognoz dotyczących wzrostu zachorowania na nowotwory trzonu macicy w populacji polskiej stanowi opracowany raport „Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku” (Didkowska i wsp., 2009). Zgodnie z przedstawionymi w nim danymi do roku 2025 w Polsce nastąpi ok. dwukrotny wzrost liczby zachorowań na nowotwory trzonu macicy, przy jednoczesnym niezmiennym lub nieznacznym wzroście umieralności. Przewidywany wzrost zachorowań na poziomie 2,3% rocznie, spowoduje w ciągu najbliższych dwóch dekad zwiększenie liczby zachorowań, szczególnie w grupie kobiet w średnim (roczny wzrost o 1,8%) i w starszym (roczny wzrost o 3,1%) wieku. Szacuje się, że do roku 2025 zachorowania na nowotwory trzonu macicy w ostatniej grupie wiekowej wyniosą ponad 60% wszystkich przypadków. Umieralność na ten typ nowotworu, poza niewielkim trendem spadkowym w grupie kobiet młodych (roczny spadek o 4,7%) oraz w średnim wieku (roczny spadek o 1,5%) i jednocześnie z niezmiennym odsetkiem zgonów w grupie kobiet starszych (rocznie spadek o 0,1%), będzie stanowiła do 2025 roku powyżej 80% zgonów wśród grupy kobiet powyżej 65 roku życia (Didkowska i wsp., 2009).

W związku z powyższym w najbliższej przyszłości należy oczekiwać znacznego wzrostu liczby nowych przypadków raka trzonu macicy w populacji polskiej. Dlatego też poznanie molekularnych podstaw rozwoju tego typu nowotworu wydaje się być nie tylko interesujące ze względów poznawczych, lecz przede wszystkim może przyczynić się do opracowania nowych metod diagnostycznych i prognostycznych, bądź nowatorskich terapii antynowotworowych.

1.1.2. Etiologia i czynniki ryzyka

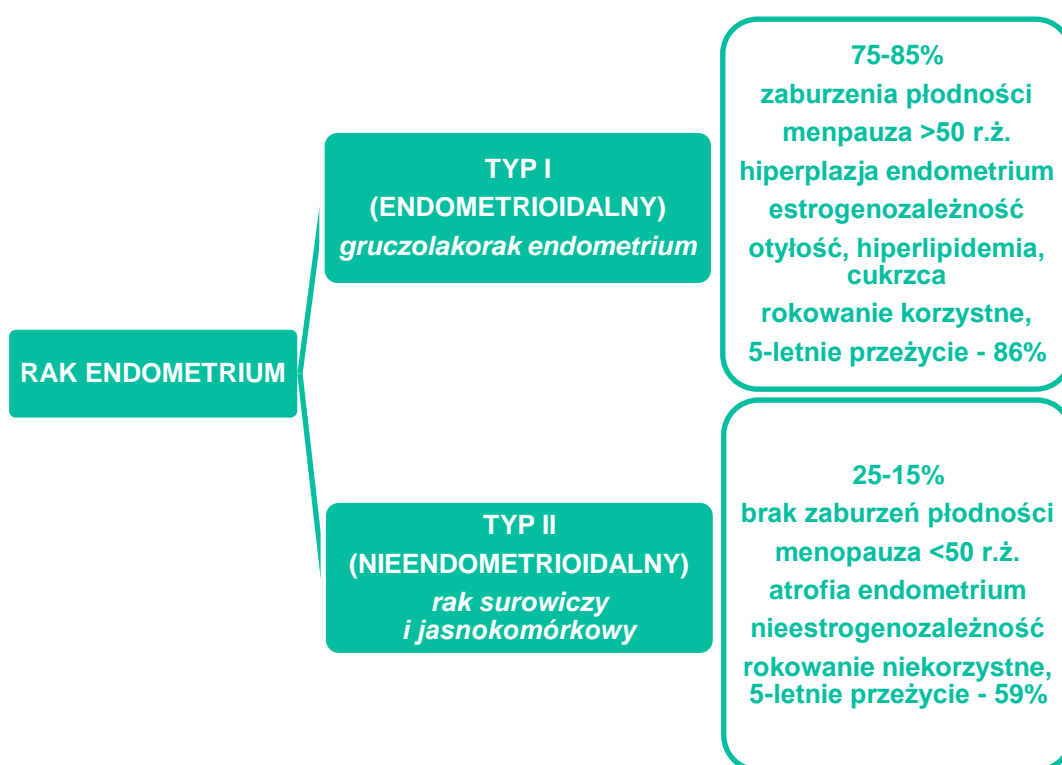
Za pierwotny czynnik etiologiczny leżący u podstaw zmian rozrostowych endometrium oraz rozwoju raka uważa się długotrwałą i nie zrównoważoną stymulację estrogenową (Key i Pike, 1988). Obserwowany hiperestrogenizm może mieć charakter zarówno endogennej (bezwzględnej lub względnej), jak również egzogennej (Jesioneck-Kupnicka i wsp., 2007; Krasner, 2009). Do głównych przyczyn hiperestrogenizmu endogennej należą m.in., przewlekłe cykle bezowulacyjne (w następstwie zespołu policystycznych jajników), nadmierna

konwersja androstendionu do estronu oraz aromatyzacja androgenów do estradiolu w tkance tłuszczowej, a także obecność hormonalnie czynnych nowotworów (Bermont i wsp., 2001; Krasner, 2009; Wild i wsp., 2000). Egzogenna stymulacja taka jak stosowanie hormonalnej terapii zastępczej niezrównoważonej gestagenami w kontroli przebiegu menopauzy, bądź leczenie tamoksyfenem w przypadku raka piersi lub prewencyjnie u grupy pacjentek wysokiego ryzyka, również wiąże się ze zwiększoną zachorowalnością na raka endometrium (Fisher i wsp., 1994; Grady i wsp., 1995; Pike i wsp., 1997; Shapiro i wsp., 1985). Udowodniono także zwiększoną zachorowalność na nowotwory trzonu macicy w przypadku kobiet, u których wystąpiło wczesne *menarche* oraz późna menopauza, nierództwo, nadciśnienie tętnicze, otyłość, cukrzyca, ekspozycja na promieniowanie jonizujące w obrębie miednicy mniejszej oraz dobre warunki socjoekonomiczne (Calle i wsp., 2003; Lochen i Lund, 1997; McCullough i wsp., 2008; Renehan i wsp., 2008; Schouten i wsp., 2004; Soliman i wsp., 2006; von Gruenigen i wsp., 2005). Natomiast czynnikami istotnie zmniejszającymi ryzyko rozwoju raka trzonu macicy są: stosowanie antykoncepcji w postaci doustnej i/lub wkładek domaciczych, wielodzietność, ciąża w starszym wieku oraz estrogenowo-progesteronowa hormonalna terapia zastępcza. Istnieją także doniesienia, wskazujące na niższą częstość zachorowania na nowotwory trzonu macicy związaną z paleniem papierosów, zwłaszcza u kobiet w wieku pomenopauzalnym (Beining i wsp., 2008; Beral i wsp., 2005; Hinkula i wsp., 2002; Lambe i wsp., 1999; Zhou i wsp., 2008). Rozwój raka endometrium może również towarzyszyć zespołom chorób o podłożu genetycznym, tj. zespołowi Lyncha (dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością, HNPCC, ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*) lub zespołowi Cowdena, w których stwierdza się mutacje w genach naprawy błędnego parowania zasad *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *MSH6* oraz fosfatazy *PTEN* (Bonadona i wsp., 2011; Eng, 2003; Meyer i wsp., 2009; Zhou i wsp., 2002).

1.1.3. Typy kliniczno-patologiczne

Rak endometrium należy do grupy nowotworów o zróżnicowanym pochodzeniu histopatologicznym, morfologii, drodze karcynogenezy oraz przebiegu klinicznym. Precyzyjne określenie podtypu histologicznego raka

endometrium odgrywa decydującą rolę o znaczeniu prognostycznym, jak również predykcyjnym. Obecny podział nowotworów endometrium pod względem kliniczno-patologicznym obejmuje dwa zaproponowane przez Bokhmana w 1983 roku typy, tj. typ I – rak endometrioidalny (*ang. endometrioid type of endometrial cancer*) oraz typ II – rak nieendometrioidalny (*ang. non-endometrioid type of endometrial cancer*) (**Ryc. 1.2.**) (Bokhman, 1983). Podział ten został oparty na obserwacjach klinicznych oraz korelacji danych kliniczno-patologicznych. Późniejsze badania molekularne potwierdziły zasadność powyższego podziału.



Rycina 1.2. Typy i charakterystyka kliniczno-patologiczne raka endometrium.

Rak endometrioidalny jest najczęściej występującym typem raka trzonu macicy i stwierdza się go w 75-85% przypadków. Charakteryzuje się w swej morfologii wysokim podobieństwem do prawidłowej śluzówki macicy, o obrazie przylegających struktur gruczołowych z małą ilością podścieliska. Jest to rak wysoce zróżnicowany o stopniach złośliwości wg WHO od 1 do 3. W przypadku niższego różnicowania komórek nowotworowych obserwuje się wzrost komponenty lżej wraz z towarzyszącą atypią. Ponadto, w preparatach

histopatologicznych zaklasyfikowanych do typu I możliwe jest występowanie cechy zróżnicowania płaskonabłonkowego lub śluzowego. Rokowanie dla tego typu nowotworów jest pomyślne, jednakże uzależnione jest ono od stadium choroby w momencie postawienia diagnozy. U podstaw raka endometrioidalnego leży nadmierna ekspozycja błony śluzowej trzonu macicy na estrogeny, która początkowo prowadzi do zmian rozrostowych (proste lub złożone bez atypii lub z atypią). Za pierwotną zmianę przedrakową uważa się atypowy rozrost endometrium, który w 25% przypadków pacjentek ulega przekształceniu w zmianę nowotworową. Obecność zmian nowotworowych stwierdza się często w badaniu histopatologicznym macicy usuniętej z powodu rozrostu atypowego endometrium. Najnowszy podział wyróżnia dwie kategorie zmian rozrostowych w obrębie endometrium, tj. łagodną hiperplazję hormonozależną oraz potencjalnie złośliwą wewnątrznabłonkową neoplazję endometrium (EIN, *ang. endometrial intraepithelial neoplasia*). Łagodne zmiany hiperplastyczne cechuje poliklonalność komórek w przeciwieństwie do zmian EIN, które posiadają monoklonalny charakter i zwiększają ok. 45-krotnie ryzyko wystąpienia raka endometrium (Bokhman, 1983; Burke i wsp., 2014; Hecht i wsp., 2005; Jesionek-Kupnicka i wsp., 2007; Krasner, 2009; Mutter i wsp., 2007; Owings i Quick, 2014; Tavassoli i Devilee, 2003).

Typ II raka endometrium obejmuje przede wszystkim raki surowicze i jasnokomórkowe, cechujące się niższą częstością występowania (10-20%), gorszym rokowaniem oraz nieznanym mechanizmem powstawania, niepoprzedzonym tak jak w przypadku raka endometrioidalnego stanem przedrakowym, choć istnieje pogląd, według którego za prekursora raka surowiczego uznaje się raka *in situ* (EIC, *ang. endometrial in situ carcinoma*). Rozwój i progresja raka typu II niepoprzedzona jest zwiększoną ekspozycją na estrogeny i dotyczy kobiet w późniejszym wieku. Pacjentki, u których diagnozuje się raki nieendometrioidalne są średnio od 5 do 10 lat starsze niż w przypadku rozpoznania nowotworów endometrium typu I. Nowotworom tym przypisuje się bezwzględnie trzeci stopień złośliwości w skali WHO. W większości przypadków rak nieendometrioidalny wykazuje zmiany metastatyczne już w chwili rozpoznania, naciekając surowicówkę macicy, jajowody bądź tworząc

ogniska wtórne w otrzewnej (Bokhman, 1983; Burke i wsp., 2014; Liu, 2007; Tavassoli i Devilee, 2003).

1.1.4. Klasyfikacja kliniczno-patologiczna

Klasyfikacja kliniczno-patologiczna raka endometrium obejmuje:

- typ histopatologiczny
- stopień histologicznej dojrzałości G (*ang. grading*) (Gx; G1-G3)
- stopień zaawansowania kliniczno-patologicznego wg skali FIGO (*fr. Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) (FIGO I-IV)
- głębokość naciekania mięśniówki trzonu macicy (<50%; ≥50% grubości mięśniówki trzonu macicy)
- obecność komórek nowotworowych w okolicznych węzłach chłonnych (nieobecne, obecne)
- ocenę naciekania światła naczyń krwionośnych (nienaciekający; naciekający)

Klasyfikacja histopatologiczna

Klasyfikację histopatologiczną raka endometrium wg zaleceń WHO z uwzględnieniem typów kliniczno-patologicznych raka przedstawia **tabela 1.1.**

Tabela 1.1. Klasyfikacja histopatologiczna raka endometrium (Tavassoli i Deville, 2003; Bokhman, 1983).

RAK ENDOMETRIUM	
TYP KLINICZNO-PATOLOGICZNY	TYP HISTOLOGICZNY/WARIANT
typ I – rak endometrioidalny (<i>endometrioid type endometrial cancer</i>)	gruczolakorak (<i>adenocarcinoma</i>)[#]: <ul style="list-style-type: none"> • wydzielniczy (<i>secretory variant</i>) • urzęsiony (<i>ciliated variant</i>) • gruczołowo-kosmkowy (<i>villoglandular variant</i>) • gruczolakorak ze zróżnicowaniem płaskonabłonkowym (<i>variant with squamous differentiation</i>) śluzowy (<i>mucinous adenocarcinoma</i>)
typ II – rak nieendometrioidalny (<i>non-endometrioid type endometrial cancer</i>)	surowiczy (<i>serous adenocarcinoma</i>)[#] jasnokomórkowy (<i>clear cell adenocarcinoma</i>)[#] płaskonabłonkowy (<i>squamous cell carcinoma</i>) mieszany (<i>mixed adenocarcinoma</i>) przejściowokomórkowy (<i>transitional cell carcinoma</i>) drobnokomórkowy (<i>small cell carcinoma</i>) niezróżnicowany (<i>undifferentiated carcinoma</i>) carcinosarcoma (<i>malignant mullerian mixed tumor</i>)

[#] najczęściej występujący

Stopień histologicznej dojrzałości komórek nowotworowych

Proporcja pomiędzy składnikiem litym niepłaskonabłonkowym a komponentą gruczołową raka endometrium określa stopień histologicznej dojrzałości komórek nowotworowych G, tzw. „grading”. Wysoki poziom zróżnicowania komórek nowotworowych determinuje niższą złośliwość raka, tym samym zwiększając szanse na pomyślne rokowanie dla pacjentki. Skala zróżnicowania komórek nowotworowych obejmuje następujące stopnie, tj. Gx – stopień dojrzałości histologicznej nie może być oceniony, G1 – niepłaskonabłonkowe lite pola zajmują do 5%, G2 – niepłaskonabłonkowe lite pola stanowią od 6% do 50%, G3 – powyżej 50% guza to komponenta lita.

Ocena kliniczno-patologiczna według skali FIGO

Skala zaawansowania kliniczno-patologicznego wg FIGO, dedykowana nowotworom ginekologicznym, stanowi syntetyczny system oceny stopnia zaawansowania raka endometrium. Uwzględnia ona zarówno pierwotną lokalizację guza, obecność naciekania na struktury macicy oraz innych narządów, obecność komórek nowotworowych w okolicznych węzłach chłonnych, bądź występowanie odległych zmian przerzutowych. Aktualną zmodyfikowaną klasyfikację wg FIGO wraz z odsetkiem 5-letnich przeżyć przedstawia **tabela 1.2.**

Tabela 1.2. Klasyfikacja raka endometrium wg skali FIGO wraz z odsetkiem 5-letnich przeżyć (Edey i Murdoch, 2010; Pecorelli, 2009).

STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA wg FIGO ¹	CHARAKTERYSTYKA	PRZEŻYWALNOŚĆ 5-letnia [%]
I	rak ograniczony ściśle do trzonu macicy	85
IA	rak nienaciekający lub naciekający mięśniówkę macicy poniżej połowy jej grubości	
IB	rak naciekający połowę lub więcej grubości mięśniówki macicy	
II	rak ograniczony do macicy, naciekający podścielisko szyjki macicy ²	75
III	rak rozprzestrzeniający się lokalnie i/lub regionalnie	45
IIIA	rak naciekający błonę surowiczą trzonu macicy i/lub przydatków	
IIIB	rak zajmujący pochwę i/lub przymacice	
IIIC	rak przerzutujący do miednicznych i/lub okołoaortalnych węzłów chłonnych	
IIIC1	rak przerzutujący do miednicznych węzłów chłonnych	
IIIC2	rak przerzutujący do okołoaortalnych węzłów chłonnych z zajęciem lub nie węzłów miednicy	
IV	rak naciekający pęcherz moczowy i/lub śluzówkę jelita grubego oraz/lub obecne odległe przerzuty	25
IVA	rak naciekający pęcherz moczowy i/lub śluzówkę jelita grubego	
IVB	rak przerzutujący do odległych narządów, tj. narządów jamy brzusznej i/lub węzłów chłonnych pachwinowych	

¹ stopnie dojrzałości histologicznej G1, G2 lub G3; ² wymagane potwierdzenie cytologiczne; zacienienie – ostatnie modyfikacje klasyfikacji FIGO.

1.1.5. Heterogenność raka endometrium – dwa czy więcej typów klinicznych raka endometrium

Zaproponowany przez Bokhmana w 1983 roku dichotomiczny podział raka endometrium wydaje się być nieadekwatny w świetle najnowszych badań molekularnych prowadzonych dla tego typu nowotworu (Bokhman, 1983; Murali i wsp., 2014). Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy nowotwory endometrium cechują się znaczną heterogennością występującą nie tylko pomiędzy kliniczno-

patologicznymi typami I i II, tj. rakiem endometrioidalnym i nieendometrioidalnym, lecz również w obrębie danego typu. Obserwowane zróżnicowanie kliniczno-patologiczne wśród pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem trzonu macicy oraz badania molekularne wskazują na zasadność wydzielenia dodatkowych podtypów lub przegrupowanie już istniejących typów klinicznych raka endometrium. Potrzebę opracowania nowego podziału potwierdzają badania dotyczące zarówno oceny czynników ryzyka, przeżywalności, związków z obecnością zmian rozrostowych czy zmian molekularnych, w szczególności w przypadku nowotworów endometrioidalnych, w których stwierdzono niski stopień zróżnicowania komórek nowotworowych (G3EC, *ang. G3 endometrioid carcinoma*), stanowiących 10-19% przypadków raka typu I. Kwestią sporną pozostaje jednak fakt, czy nowotwory G3EC stanowią oddzielną kategorię, czy może są grupą pośrednią między typem I a typem II raka endometrium. Voss i wsp. (2012) wykazali, że rak G3EC nie wykazuje statystycznie istotnych różnic w porównaniu z rakiem o histologii surowiczej i jasnokomórkowej, zarówno pod względem wieku zachorowania pacjentek, stadium zaawansowania w momencie diagnozy, przeżywalności, jak i charakterystyki immunohistochemicznej, tj. ekspresji receptorów dla sterydów (ER, *ang. estrogen receptor*; PR, *ang. progesteron receptor*) oraz markerów TP53 i Her-2. Z kolei badania Zannoniego i wsp. (2010) wskazują na pośredni charakter nowotworów G3EC. (Brinton i wsp., 2013; Voss i wsp., 2012; Zannoni i wsp., 2010; Zannoni i wsp., 2012). Odstępstwa od cech klasycznych typów raka endometrium wg Bokhama stwierdzono również w przypadku nowotworów surowicznych uznawanych za prototyp raka typu II, gdzie ok. 2% nowotworów rozwija się na podłożu zmian rozrostowych, a w 20% przypadków obserwuje się brak charakterystycznego dla tej grupy, głębokiego naciekania mięśniówki trzonu macicy (Soslow i wsp., 2007). Opracowanie nowej klasyfikacji klinicznej nowotworów endometrium z całą pewnością może przyczynić się do modyfikacji już istniejących schematów leczenia, jak również stanowić podstawą poszukiwania nowych celów terapeutycznych, skutkując w dalszej perspektywie opracowaniem terapii personalizowanych, dedykowanych nie tylko określonej typowi nowotworu, lecz przede wszystkim konkretnemu pacjentowi.

1.2. Sygnalizacja komórkowa indukowana transformującymi czynnikami wzrostu typu β

1.2.1. Nadrodzina transformujących czynników wzrostu typu β

Nadrodzina transformujących czynników wzrostu typu β (TGF β , *ang. transforming growth factors β type superfamily*) to liczna grupa ligandów utrwalonych (*ang. conserved*) ewolucyjnie, o aktywności cytokin zaangażowanych w inicjację oraz regulację różnorodnych procesów komórkowych, fizjologicznych i patologicznych. Sygnalizacja indukowana czynnikami TGF β warunkuje prawidłowy rozwój embrionalny oraz homeostazę tkankową, w tym angiogenezę, regenerację tkanek, modulowanie odpowiedzi immunologicznej, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, *ang. extracellular matrix*), ruchliwość komórek, czy apoptozę zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych, a w szczególności podczas rozwoju, progresji i przerzutowania nowotworów (Derynck i wsp., 2014; Derynck i Akhurst, 2007; Derynck i Miyazono, 2008; Li i Flavell, 2008; Massague, 2008; Tian i wsp., 2011; Travis i Sheppard, 2014; Wu i Hill, 2009; Zakrzewski, 2012). Wyżej wymienione procesy podlegają ścisłej kontroli przez czynniki TGF β , a odpowiedź komórkowa uzależniona od typu tkanki i jej stanu fizjologicznego, może stymulować proliferację, różnicowanie, migrację komórek lub apoptozę. Plejotropowa aktywność szlaku sygnalizacyjnego indukowanego czynnikami z nadrodziny TGF β jest odzwierciedleniem znacznego stopnia złożoności przekazywanego za jego pośrednictwem sygnału. Złożoność tę obserwuje się już na poziomie ligandów TGF β , których do tej pory zidentyfikowano ponad 30. Za białko prototypowe, od którego zaczerpnięto nazwę całej nadrodziny, uznaje się zidentyfikowany jako pierwszy pod koniec lat siedemdziesiątych XX wieku, czynnik TGF β (De Larco i Todaro, 1978; Moses i wsp., 1981; Roberts i wsp., 1981). Jak wykazały późniejsze badania czynnik ten występuje w komórkach człowieka w postaci trzech izoform, tj. TGF β 1, TGF β 2 i TGF β 3, których geny zlokalizowane są na długich ramionach odpowiednio chromosomów 19q13, 1q41 i 14q23-4, a podobieństwo sekwencji aminokwasowej wynosi 71% - 80% (Moses i Roberts, 2008). Oprócz izoform czynnika TGF β do nadrodziny TGF β należą: aktywiny (ACTs, *ang. actvins*), inhibiny (INHs, *ang. inhibins*), białka morfogenetyczne kości (BMPs, *ang. bone morphogenetic*

proteins), czynniki wzrostu i różnicowania (GDFs, *ang. growth and differentiation factors*), czynniki warunkujące asymetrię lewo-prawą (nodal i lefty), czynnik MIS/AMH (*ang. Müllerian-inhibiting substance/anti- Müllerian hormone*) oraz czynniki neurotroficzne pochodzące z komórek glejowych (GDNFs, *ang. glial cell-derived neurotrophic factors*) (De Caestecker M., 2004; Derynck i Miyazono, 2008; Miyazono i wsp., 2005; Saarma, 2000; Shi i Massague, 2003). Wspólną cechą czynników TGF β jest ich synteza w postaci pre-probiałka, dimeryczna struktura postaci natywnej oraz występowanie w strukturze pierwszorzędowej aktywnych ligandów utrwalonego ewolucyjnie motywu składającego się z 6 do 12 reszt cysteiny, określanego jako węzeł cysteinowy (CK, *ang. cysteine knot*). Analizując sekwencje aminokwasowe motywu CK czynników nadrodziny TGF β wyróżnić można dwie podrodziny, tj. TGF β s/ACTs/INHs/lefty/GDF-8(miostatyna)/GDNF/MIS oraz BMP/GDF/nodal (Galat, 2011). Obecność węzła cysteinowego odpowiedzialna jest za formowanie homo- i heterodimerów czynników TGF β , a ich aktywna forma ma masę cząsteczkową ok. 25 kDa. Proces biosyntezy, modyfikacji potranslacyjnych oraz sekrecji dojrzałej formy czynników nadrodziny TGF β przebiega etapowo. Nowo zsyntetyzowane monomeryczne pre-probiałko o m.c. ok. 75kDa (390-412 aa) składa się począwszy od N-końca z 29 aminokwasowego peptydu sygnałowego (SP, *ang. signal peptide*), 249 aminokwasowej prodomeny LAP (*ang. latency-associated peptide*) oraz 112 aminokwasowego monomeru TGF β (Derynck i wsp., 1985; Gentry i Nash, 1990; Gray i Mason, 1990; Tirado-Rodriguez i wsp., 2014). W pierwszej kolejności następuje usunięcie fragmentu SP oraz dimeryzacja pozostałych fragmentów probiałka za pomocą trzech mostków disiarczkowych, utworzonych między resztami cystein w pozycjach 223, 226, 356. Następnie tak powstały dimer o masie ok. 110 kDa ulega proteolitycznemu cięciu przez proteazę furynową w biegunie *trans* aparatu Golgiego. Jednakże uwolnione fragmenty LAP pozostają niekowalencyjnie związane w dimerze pro-TGF β , tworząc mały kompleks latentny (SLC, *ang. small latent complex*). Sekrecję natywnych czynników TGF β do ECM poprzedza formowanie dużego kompleksu latentnego TGF β (LLC, *ang. large latent TGF β complex*), które następuje przez związanie mostkami disiarczkowymi SLC z białkiem LTBP (*ang. latent TGF β binding protein*). Przyłączenie białka LTBP odpowiada za czasową inaktywację LLC, wydłużenie jego półtrwania oraz magazynowanie czynników TGF β

w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, poprzez bezpośrednią interakcję z komponentami ECM, tj. fibryliną 1 oraz fibronektyną. Ponadto obecny w C-końcu sekwencji aminokwasowej LAP motyw RGD (Arg-Gly-Asp) umożliwia wiązanie się LLC z integrynami (Keski-Oja i wsp., 2004; Munger i Sheppard, 2011; Rifkin, 2005; Todorovic i wsp., 2005). Aktywacja dimerów TGF β następuje głównie na drodze proteolitycznego cięcia LLC i może zachodzić przy udziale plazminy, metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej 1 i 9 (MMP1, MMP9, *ang. matrix metalloproteinase 1,9*) oraz białka morfogenetycznego kości 1 (BMP1) o aktywności metaloproteinazy, nienależącego do rodziny TGF β . Innymi czynnikami mogącymi aktywować TGF β są trombospondyna 1 (THBS1, *ang. thrombospondin 1*), kwas retinowy, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, *ang. basic fibroblasts growth factor*), jak również reaktywne formy tlenu (ROS, *ang. reactive oxygen species*) oraz niskie pH w ECM (Annes i wsp., 2003; Hyytiainen i wsp., 2004; Poniatowski i wsp., 2015; Tirado-Rodriguez i wsp., 2014).

1.2.2. Kanoniczna sygnalizacja komórkowa indukowana czynnikami TGF β

Kanoniczna sygnalizacja komórkowa indukowana ligandami należącymi do nadrodziny TGF β zachodzi przy udziale wysoce specyficznych receptorów o aktywności kinaz serynowo/treoninowych, których ekspresję stwierdza się w większości typów komórek człowieka. Receptory TGF β należą do glikoprotein przezbłonowych o wyraźnie zaznaczonym regionie N-końcowym odpowiedzialnym za wiązanie ligandów, pojedynczym fragmencie transbłonowym oraz C-końcowym regionie cytoplazmatycznym, w którym zlokalizowana jest domena kinazowa. Podobieństwo strukturalne oraz funkcjonalne receptorów TGF β , pozwoliło na wydzielenie w ich obrębie dwóch podtypów, tj. receptorów TGF β typu I oraz receptorów TGF β typu II (Massague i Gomis, 2006). Cechą strukturalną odróżniającą receptory typu I od receptorów typu II jest obecność w ich sekwencji 30-aminokwasowego motywu GS (*ang. GS region*) bogatego w reszty glicyny i seryny (Thr-Thr-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly), ulokowanego powyżej domeny kinazowej, który pełni funkcję regulatorową (Franzen i wsp., 1995; Okadome i wsp., 1994; Wieser i wsp., 1995). W genomie człowieka zidentyfikowano siedem genów kodujących receptory typu I, a ich produkty

białkowe określane są w literaturze jako ALK1-7 (*ang. activin receptor like-kinases*), przy czym w przypadku receptora ALK5 stosowany jest akronim TGFβR1. W przeciwieństwie do receptorów typu I, receptory typu II wykazują konstytutywną aktywność domeny kinazowej, której stopień homologii sekwencji aminokwasowej z receptorem typu I wynosi 41%. Zidentyfikowanych zostało pięć receptorów typu II, tj. ActRII, ActRIIB (*ang. activin receptor type II, IIB*), BMPRII (*ang. bone morphogenetic protein receptor type II*), MISRII/AMHRII (*ang. Müllerian-inhibiting substance receptor type II/anti- Müllerian hormone receptor type II*) oraz TGFβR2 (ten Dijke i Hill, 2004). W **tabeli 1.3.** przedstawiono receptory oraz ligandy ścieżki sygnałowej TGFβ.

Tabela 1.3. Receptory i ligandy szlaku TGFβ (Zakrzewski, 2012).

RECEPTORY	LIGANDY
Typu I	
ALK1	aktywina A, BMP-9, TGFβ1, TGFβ3
ALK2	aktywina A, BMP-6, BMP-7, MIS/AMH, TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3
ALK3 (BMPRIa)	BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7
ALK4	aktywina A, GDF-1, GDF-11, nodal
TGFβR1 (ALK5)	TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3
ALK6 (BMPRIb)	BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6, GDF-9b, MIS/AMH
ALK7	nodal
Typu II	
ActRII	aktywina A, BMP-2, BMP-6, BMP-7, GDF-1, GDF-5, GDF-8, GDF-9b, GDF-11, inhibina A, inhibina B
ActRIIb	aktywina A, BMP-2, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-8, GDF-11, inhibina A, inhibina B, nodal
BMPRII	BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6, GDF-9b
MISRII/AMHRII	MIS/AMH
TGFβR2	TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3
Pomocnicze	
BETAGLIKAN (TGFβR3)	BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-5, inhibina A, inhibina B, TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3
ENDOGLINA (CD105)	aktywina A, BMP-2, BMP-7, TGFβ1, TGFβ3
CD109	TGFβ1, TGFβ3

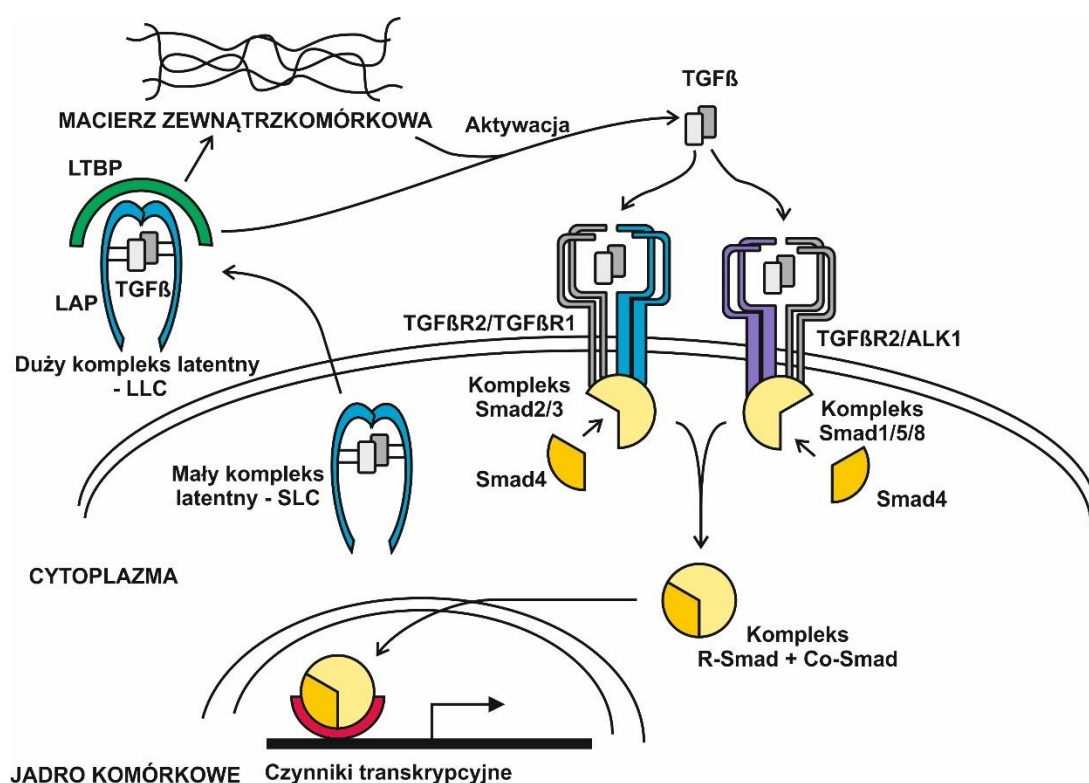
W przypadku braku natywnych ligandów receptory obu typów mogą występować w błonie komórkowej zarówno w postaci homo- (TGFβR1:TGFβR1; TGFβR2:TGFβR2), jak i heterodimerów (TGFβR1:TGFβR2), jednakże jedynie forma

heterotetrameryczna receptorów $(TGF\beta R1:TGF\beta R2)_2$ wykazuje zdolność aktywowania swoistych białek efektorowych (Huang i wsp., 2011). Aktywacja kanonicznego szlaku $TGF\beta$ następuje w momencie związania się dimerycznego ligandu $TGF\beta$ z dimerem receptora $TGF\beta$ typu II, który posiadając konstytutywną aktywność kinazową ulega autofosforylacji. Do tak powstałego kompleksu $TGF\beta$ - $TGF\beta R2$ przyłączany jest dimer receptora $TGF\beta R1$, który następnie jest fosforylowany na resztach seryny i treoniny obecnych w regionie GS, przez zaktywowany receptor $TGF\beta R2$. Za przyłączanie receptorów $TGF\beta$ typu I odpowiedzialne są zmiany konformacyjne struktury receptora $TGF\beta$ typu II zachodzące po związaniu ligandów. Na skutek zmiany konformacji receptorów $TGF\beta R1$ następuje odłączenie od jego centrum aktywnego białka FKBP12 (*ang. immunophilin 12-kd **FK506 binding protein***) i aktywacja domeny kinazowej (Huse i wsp., 1999; Kang i wsp., 2009). Niektóre spośród ligandów należących do nadrodziny $TGF\beta$ wykazują powinowactwo do więcej niż jednego receptora typu II oraz typu I, co tłumaczy pleiotropową rolę sygnalizacji $TGF\beta$ w komórkach prawidłowych oraz stanach patologicznych (Drabsch i ten Dijke, 2011; Drabsch i ten Dijke, 2012; Oshimori i Fuchs, 2012; Travis i Sheppard, 2014).

Zainicjowany w powyższy sposób w ECM sygnał przekazywany jest w dalszym etapie przez receptory $TGF\beta$ typu I na białka cytoplazmatyczne Smad (*ang. similar to mother against + mother against to decapentaplegic*). W komórkach człowieka identyfikuje się osiem białek efektorowych Smad, zgrupowanych w trzech podklasach, tj. receptorowe R-Smad (*ang. receptor-activated **Smad***), pośredniczące Co-Smad (*ang. common-mediators **Smad***) oraz inhibitorowe I-Smad (*ang. inhibitory **Smad***). Aktywacja określonych białek R-Smad następuje w wyniku ich fosforylacji przez receptory $TGF\beta$ typu I i jest uzależniona od rodzaju ligandu inicjującego sygnalizację. Do przedstawicieli R-Smad należą białka Smad1, 5 i 8, które ulegają aktywacji pod wpływem czynników BMP oraz białka Smad2 i 3 pośredniczące w przekazywaniu sygnału pochodzącego od czynników $TGF\beta$ oraz aktywiny (Principe i wsp., 2014; ten Dijke i Hill, 2004). Białka R-Smad ponadto oddziałują z wieloma białkami pełniącymi funkcję opiekuńczą (*ang. chaperon proteins*), warunkującymi przyłączanie się R-Smad do kompleksu receptorowego $TGF\beta$ oraz ich aktywację. Białkami odpowiedzialnymi za deponowanie i odpowiednią lokalizację R-Smad w cytoplazmie są m.in., białka SARA (*ang. **SMAD***

anchor for receptor activation), endofiny oraz ERBIN (*ang. **Erb**b2-interacting protein*) (Drabsch i ten Dijke, 2012; Massague i Gomis, 2006; Miyazono i wsp., 2010; Sflomos i wsp., 2011; Shi i wsp., 2007; Tsukazaki i wsp., 1998).

Z aktywowanym kompleksem białek R-Smad wiąże się białko Smad4 pełniące funkcję pośredniczącego Co-Smad. Następnie heterotrimery R-Smad/Co-Smad ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie w sposób bezpośredni lub pośrednio w połączeniu z innymi białkami, pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych, modulując ekspresję genów zależnych od czynników TGFβ (Ryc. 1.3.) (Ranganathan i wsp., 2007).



Rycina 1.3. Kanoniczna sygnalizacja indukowana czynnikami TGFβ; wyjaśnienie skrótów w tekście (Zakrzewski, 2012).

Regulacja ekspresji genów za pośrednictwem białek Smad odbywa się poprzez oddziaływanie ich domeny MH1 (*ang. **mad**-homology domain 1*) z sekwencją CAGACA, określaną jako SBE (*ang. **Smad**-binding element*), bądź z sekwencjami bogatymi w pary GC określanymi, jako motywy BRE (*ang. **BMP**-response element*). Białka Smad stanowią również kofaktory takich czynników transkrypcyjnych jak FOX (*ang. **fork**head box*), HOX (*ang. **homed**omain box*), RUNX

(ang. **runt**-related transcription factor box), E2F, AP1 (ang. **activator protein 1**), CREB/ATF (ang. **cAMP response element binding protein/activating transcription factors**), czy czynników transkrypcyjnych zawierających domeny o strukturze palców cynkowych, w tym Evi-1 (ang. *ecotropic virus integration site 1 protein homolog*), Snail1/2 (czynniki transkrypcyjne kodowane przez geny *SNAI1* i *SNAI2*) oraz ZEB-1/2 (ang. **zinc finger E-box-binding homeobox 1/2**) (Dennler i wsp., 2002; Drabsch i ten Dijke, 2012; Heldin i Moustakas, 2012; Massague i Gomis, 2006; Oshimori i Fuchs, 2012). Zestawienie wybranych białek, których ekspresja regulowana jest aktywnością szlaku sygnalizacyjnego TGF β na drodze Smad-zależnej, a także ich zaangażowanie w poszczególne procesy komórkowe przedstawia **tabela 1.4**.

Tabela 1.4. Procesy komórkowe oraz wybrane białka w nie zaangażowane podlegające regulacji transkrypcyjnej przy udziale sygnalizacji TGF β (na podstawie Massague i Gomis, 2006).

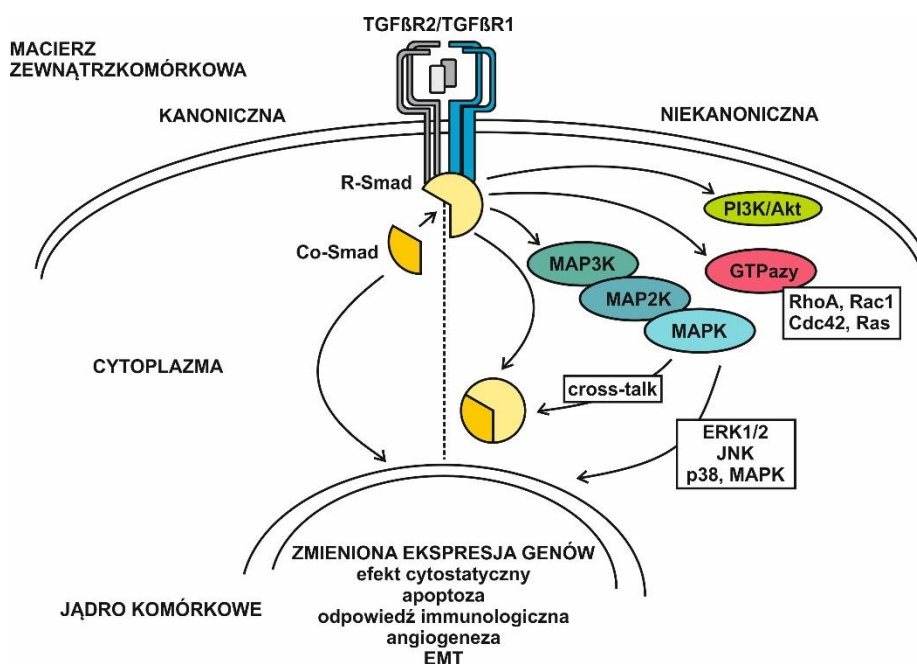
ZNACZENIE	AKTYWACJA	RESPRESJA
regulacja parakrynną	IL11, VEGF, CTGF, Jagged 1, folistatyna 3, ANGPTL4	IL1 β , IL2, BMP4
sygnalizacja komórkowa	BMPRII, VDR, EphB2, Cdc42EP3, GEF114, MEK4, SGK1,	LDLR, PGE-R4, β AR-2
regulacja transkrypcji	Ets-2, c-Jun, JunB, ATF3, GADD45 α/β , Pim1	Smad2, Smad4, C/EBP δ , MRG1, TRIP-Br2
regulacja cyklu komórkowego	p21 ^{Cip1} , p15 ^{Ink4b}	c-Myc, Id1, Id2, Id3
przebudowa ECM	PAI-1, uPa, Col VI-A1, ADAM19, integryna α 5, integryna β 1	
sprężenie zwrotne	Smurf1, Smurf2, Smad7, SnoN, LEMD3	
pozostałe	T-box3, MN1, IER3, Ig λ , OVOL1, transferaza sialowa 4A	sprouty2, IAP-3

Kanoniczna sygnalizacja TGF β podlega negatywnej regulacji, za którą odpowiedzialne są białka I-Smad, tj. Smad6 oraz Smad7. Białka I-Smad przeciwieństwie do białek R-Smad i Co-Smad w swej strukturze nie zawierają domeny MH1 odpowiedzialnej za rozpoznawanie sekwencji DNA oraz aktywność transkrypcyjną. Obecna natomiast domena MH2 warunkuje wiązanie się białka Smad7 z receptorami TGF β , tym samym współzawodnicząc z białkami R-Smad o centrum aktywne receptora TGF β typu I. Związany z białkiem Smad7 receptor

TGF β typu I kierowany jest na drogę ubikwitynozależnej proteolizy w proteasomach, w której pośredniczą białka Smurf (*ang. **Smad ubiquitin regulatory factors***). Podobnie sygnalizację komórkową TGF β hamuje białko Smad6, które wiążąc się z białkiem Smad4 ogranicza formowanie się kompleksów Smad1/Smad4 (David i wsp., 2013; Dennler i ten Dijke, 2002; Itoh i ten Dijke, 2007; Zhao i Chen, 2014).

1.2.3. Niekanoniczna sygnalizacja TGF β

Sygnalizacja indukowana czynnikami TGF β może również przebiegać na drodze niekanonicznej, w sposób niezależny od białek Smad. Aktywowane, po związaniu ligandów TGF β , receptory typu I oraz II mogą przekazywać sygnał do jądra komórkowego za pośrednictwem białek efektorowych innych ścieżek sygnałowych, w tym szlaku kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK, *ang. **mitogen-activated protein kinases***), tj. ERK1/2 (*ang. **extracellular signal-regulated kinases 1/2***), JNK (*ang. **c-Jun N-terminal kinase***), p38 (*ang. **protein 38 kDa***); szlaków zależnych od białek Rho (*ang. **Ras homologous***) należących do małych białek G (*ang. **small GTPase proteins***) oraz szlaku PI3K/Akt (*ang. **phosphatidylinositol-3-kinase/mouse bred Ak+thymoma***) (Kardassis i wsp., 2009; Mu i wsp., 2012; Zhang, 2009) (**Ryc. 1.4.**)



Rycina 1.4. „Cross-talk” sygnalizacji indukowanej czynnikami TGF β z wybranymi szlakami komórkowymi (Tian i wsp., 2011); wyjaśnienie skrótów w tekście.

Kaskada TGF β na drodze zależnej od białek Smad wykazuje również oddziaływanie (*ang. cross-talk*) z innymi szlakami komórkowymi, w tym ze szlakiem kinaz MAPK/ERK, WNT/ β -katenina (*ang. wingless+integration/ β -catenin*), Hedgehog, PI3K/Akt, NOTCH. Ponadto jej aktywność modulowana jest działaniem cytokin, które tak jak interferon γ (INF- γ , *ang. interferon γ*) oraz czynnik martwicy guzów α (TNF- α , *ang. tumor necrosis factor α*) odpowiedzialne są za aktywację ekspresji białek I-Smad (Akhurst i Hata, 2012; Guo i Wang, 2009; Ikushima i Miyazono, 2012) (**Ryc. 1.4.**).

Powyższe interakcje, niezależnie od drogi ich indukcji, tj. z udziałem lub bez białek efektorowych Smad, mogą mieć różnorodny charakter. Oddziaływania te mogą zachodzić w sposób bezpośredni, w wyniku enzymatycznej modyfikacji komponentów szlaków sygnalizacyjnych, bądź regulacji ekspresji zarówno ich ligandów, jak i pozostałych białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału. (Talar i Czyz, 2013; Tian i wsp., 2011).

1.2.4. Receptory pomocnicze kaskady TGF β

Różnorodność mechanizmów komórkowych, będących niejednokrotnie przeciwstawnymi sobie procesami pozostającymi pod kontrolą szlaku sygnalizacyjnego TGF β , jest wynikiem jego złożoności zarówno na poziomie ligandów, jak i specyficznych względem nich receptorów, a także zaangażowaniu w sygnalizację TGF β białek pełniących funkcję receptorów pomocniczych (*ang. co-receptors, accessory receptors, auxilliary receptors*), określanych w literaturze jako receptory TGF β typu III (Bernabeu i wsp., 2009; Kirkbride i wsp., 2005; Mythreya i Blobe, 2009a). Główną rolą receptorów pomocniczych, jest modulowanie przekaźnictwa komórkowego na etapie inicjacji sygnalizacji poprzez prezentowanie dimerów czynników TGF β ich dedykowanym receptorom typu I oraz typu II. Z racji pełnionej funkcji receptory pomocnicze TGF β należą do białek przezbłonowych lub zakotwiczonych w błonie komórkowej za pomocą reszt glikozylofosfatydilinozytolu (GPI, *ang. glycosylphosphatidylinositol*), a ich wspólną cechą jest brak motywów strukturalnych o aktywności enzymatycznej (Gatza i wsp., 2010; Massague i Gomis, 2006). Do tej pory zidentyfikowanych zostało kilka białek zaliczanych do receptorów pomocniczych kaskady TGF β . Należą do nich betaglikan (TGF β R3), endoglina (antygen powierzchniowy CD105,

ang. cluster of differentiation 105), antygen powierzchniowy CD109 (*ang. cluster of differentiation 109*), RGMa (*ang. repulsive guidance molecule a*), DRAGON (RGMb), hemojuvelina (RGMc), a także CRIPTO (Babitt i wsp., 2005; Babitt i wsp., 2006; Finnson i wsp., 2006; Fonsatti i wsp., 2001; Kenney i wsp., 2004; Lopez-Casillas i wsp., 1991; Samad i wsp., 2005; Wakefield i Hill, 2013). Spośród wymienionych receptorów pomocniczych tylko betaglikan, endoglina oraz antygen powierzchniowy CD109 zaangażowane są w sygnalizację pochodzącą od izoform czynnika TGF β (Bernabeu i wsp., 2009; Finnson i wp., 2006; Mokrosinski i Krajewska, 2008; Mythreye i Blobe, 2009a).

Endoglina jest homodimeryczną przezbłonową glikoproteiną o m. cz. 180 kDa wykazującą wysoki stopień powinowactwa do betaglikanu. Odgrywa ona istotną rolę w waskulogenezie oraz angiogenezie, a jej nasiloną ekspresję obserwuje się zwłaszcza w proliferującym śródbłonku naczyniowym pod wpływem hipoksji oraz w makrofagach, komórkach podścieliska, komórkach mięśni gładkich i syncytiotrofoblastie (Dallas i wsp., 2008; Tian i wsp., 2010). Znaczenie endogliny dla drugiego z wymienionych procesów zaznacza się wyraźnie w progresji i przerzutowaniu nowotworów, które nieodzownie związane są z nasiloną angiogenezą (Rosen i wsp., 2014; ten Dijke i wsp., 2008). Proangiogenna rola endogliny w transformacji nowotworowej ma związek z pośrednictwem w sygnalizacji indukowanej izoformą TGF β 1, w stosunku do której wykazuje najwyższy stopień powinowactwa (Lebrin i wsp., 2004; Zakrzewski i wsp., 2011). Indukcja sygnalizacji TGF β /ALK1 prowadzi do stymulacji proliferacji oraz migracji komórek śródbłonka, podczas gdy aktywacja szlaku TGF β /TGF β R1 ma działanie przeciwstawne (Goumans i wsp., 2002; Lebrin i wsp., 2004). Jednakże w przypadku komórek nowotworowych endoglina hamuje ich ruchliwość za pośrednictwem kompleksu receptora ALK2 i białka Smad1 (Craft i wsp., 2007; Romero i wsp., 2010).

Antygen powierzchniowy CD109 jest białkiem o m. cz. 180 kDa należącym do rodziny AMCOM (*ang. α 2-macroglobulin/complement gene family*) (Lin i wsp., 2002). Ekspresję jego stwierdza się na powierzchni aktywowanych płytek krwi i limfocytów T, w komórkach krwiotwórczych i progenitorowych subpopulacji CD34+ oraz w komórkach śródbłonka (Curtis i McFarland, 2014).

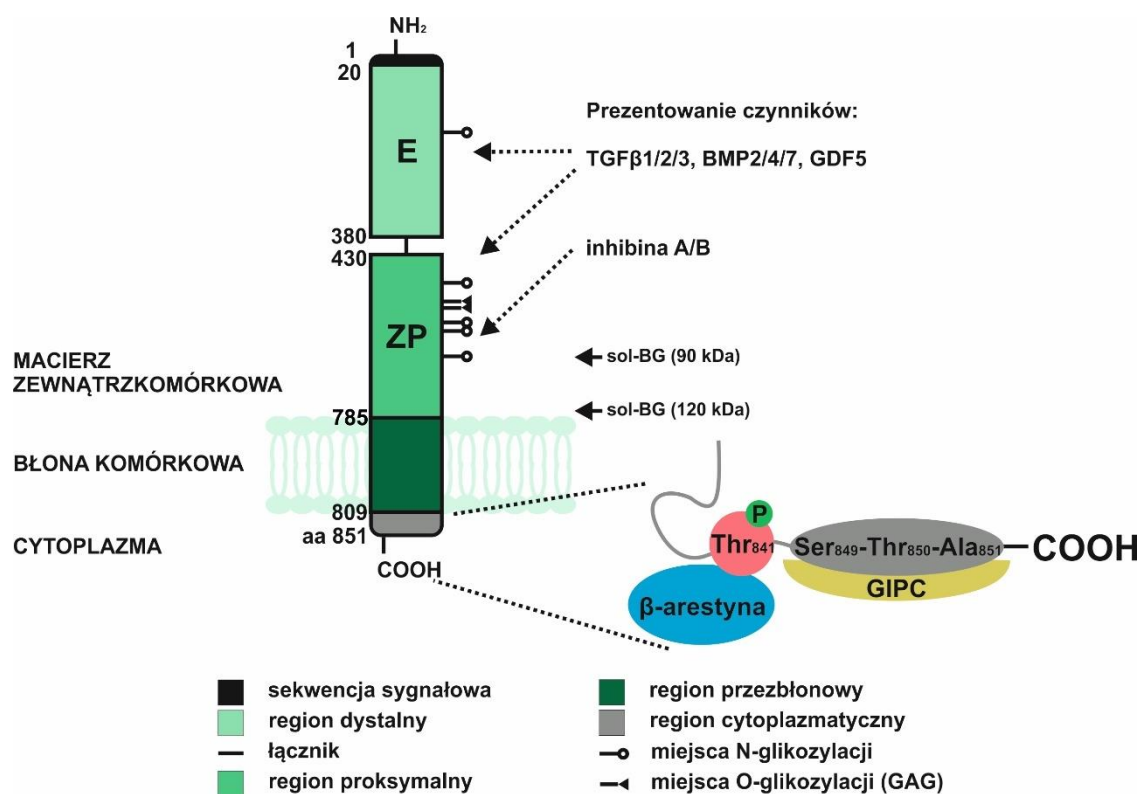
W przeciwieństwie do betaglikanu i endogliny, w strukturze antygenu CD109 nie stwierdza się regionu przezbłonowego, dlatego też do jego zakotwiczenia w błonie komórkowej niezbędna jest kotwica GPI (*ang. glycosylphosphatidylinositol anchore*) (Tam i wsp., 2003). Sekwencja aminokwasowa antygenu CD109 cechuje się niskim stopniem homologii z betalikanem oraz endogliną. Podobnie jak endoglina antygen CD109 wykazuje zróżnicowaną zdolność wiązania izoform TGFβ, spośród których najsilniej oddziałuje z czynnikiem TGFβ1, nieco słabiej z izoformą TGFβ3, jednocześnie nie wykazując powinowactwa do izoformy TGFβ2. Przekazywanie sygnału TGFβ za pośrednictwem antygenu CD109 podlega proteolitycznej regulacji przy udziale furyny (Hagiwara i wsp., 2010). Antygen CD109 pełni funkcję hamującą sygnalizację TGFβ, która szczególnie zarysowuje się w przypadku izoformy TGFβ1. Nadekspresja antygenu CD109 prowadzi do obniżenia poziomu fosforylacji białek efektorowych Smad2/3, co skutkuje zahamowaniem antyproliferacyjnej roli izoformy TGFβ1. Mechanizmem odpowiedzialnym za supresję sygnalizacji indukowanej czynnikiem TGFβ1 jest zależna od kaweoliny internalizacja aktywowanych receptorów TGFβ, prowadząca w efekcie do ich degradacji w proteasomach (Bizet i wsp., 2011). Ponadto antygen CD109 może tworzyć heterokompleksy z receptorami TGFβ typu I oraz II, zarówno w obecności, jak i braku ligandów TGFβ, a także wiązać jeden z receptorów pomocniczych, tj. betaglikan (Finnson i wsp., 2006).

Jednak nadal najlepiej poznanym zarówno pod względem strukturalnym jak i funkcjonalnym receptorem TGFβ typu III pozostaje odkryty najwcześniej betaglikan. W przeciwieństwie do pozostałych receptorów pomocniczych TGFβ ekspresję betagliaknu stwierdza się w większości typów komórek człowieka, a obecna wiedza dotycząca jego udziału w sygnalizacji TGFβ wykracza zdecydowanie poza pierwotnie opisaną jego rolę, jako receptora pomocniczego tego szlaku (Allison i wsp., 2015; Bilandzic i Stenvers, 2011; Gatza i wsp., 2010; Kang i wsp., 2009; Lee i wsp., 2010; Meyer i wsp., 2014; Mythreya i Blobel, 2009a; Mythreya i Blobel, 2009b; You i wsp., 2009).

1.2.5. Betaglikan – struktura i funkcja

Betaglikan (TGF β R3) jest pierwszym zidentyfikowanym w drugiej połowie lat osiemdziesiątych XX wieku białkiem pełniącym funkcję receptora TGF β typu III (Cheifetz i wsp., 1988b). Betaglikan kodowany jest przez gen *TGFBR3* zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 1p33-p32 (<http://www.ensembl.org>; *ENSG00000069702*). W jego sekwencji scharakteryzowane zostały dwa promotory, tj. proksymalny oraz dystalny, znajdujące się odpowiednio w odległości ok. 25 kpz oraz 45 kpz powyżej kodonu start ATG, a powstające transkrypty różnią się długością sekwencji 5'-UTR (*ang. 5'-untranslated region*) (Hempel i wsp., 2008). Ekspresja betaglikanu w większości typów komórek zachodzi przy udziale promotora proksymalnego, natomiast promotor dystalny pozostaje nieaktywny w wyniku jego metylacji. Produkt białkowy genu *TGFBR3* jest homodimerycznym proteoglikanem składającym się z 851 reszt aminokwasowych, w strukturze którego wyróżnia się wyraźnie zaznaczoną domenę zewnątrzkomórkową, pojedynczy helikalny fragment przezbłonowy oraz krótką 42 aminokwasową domenę cytoplazmatyczną (Lopez-Casillas i wsp., 1991; Moren i wsp., 1992). Jak wykazały badania z wykorzystaniem mutagenazy kierunkowej, domena zewnątrzkomórkowa betaglikanu, licząca 785 reszt aminokwasowych, jest zróżnicowana strukturalnie. W jej obrębie wyróżnia się region dystalny względem błony komórkowej zlokalizowany między resztami aminokwasowymi 1-380 (N-koniec domeny zewnątrzkomórkowej o m.cz. 45 kDa) oraz region proksymalny położony między resztami aminokwasowymi 430-785 (C-koniec domeny zewnętrznej o m.cz. 55 kDa), które połączone są 50 aminokwasowym łącznikiem o nieuorganizowanej strukturze (Mendoza i wsp., 2009). Sekwencja regionu dystalnego jest wysoce homologiczna względem innego z receptorów pomocniczych TGF β , tj. endogliny i określana jest jako domena E (*ang. endoglin-related domain*), podczas gdy region proksymalny wykazuje podobieństwo strukturalne do rodziny białek ZP (*łac. zona pellucida*) osłonki przejrzystej oocyta, tektoryny oraz uromoduliny (domena ZP). (Esparza-Lopez i wsp., 2001; Jovine i wsp., 2005; Lopez-Casillas i wsp., 1994). Domena ZP występuje w białkach ECM, warunkując ich polimeryzację z wytworzeniem długich struktur przypominających włókienka oraz oddziaływanie z innymi białkami (Jovine i wsp., 2004). Jednak w przypadku

betaglikanu domena ta pozbawiona jest we fragmencie EHP (*ang. external hydrophobic patch*), zlokalizowanym w bliskim sąsiedztwie błony komórkowej, sekwencji proteolitycznego cięcia MCS (*ang. maturation cleavage site*) (Diestel i wsp., 2013; Lin i wsp., 2011). Zarówno dystalny, jak i proksymalny region domeny zewnątrzkomórkowej betaglikanu stanowią kluczowe struktury warunkujące funkcjonalność oraz powinowactwo względem czynników TGF β . Podczas gdy wiązanie czynników TGF β 1,2,3, BMP2,4,7 oraz GDF5 zachodzi przy udziale domen E oraz ZP, to w rozpoznawanie inhibin A i B zaangażowana jest wyłącznie domena ZP (Diestel i wsp., 2013; Esparza-Lopez i wsp., 2001; Kirkbride i wsp., 2008; Lin i wsp., 2011; Makanji i wsp., 2008). Jednakże betaglikan wykazuje zróżnicowane powinowactwo względem czynników TGF β . Najsilniejsze oddziaływanie obserwuje się w przypadku izoformy TGF β 2, która to praktycznie nie wiążąc się z receptorem TGF β R2 przekazuje sygnał spoza komórki wyłącznie za pośrednictwem betaglikanu (**Ryc. 1.5.**) (Lopez-Casillas i wsp., 1991; Wiater i wsp., 2006).



Rycina 1.5. Domenowa struktura i funkcje betaglikanu (na podstawie Diestel i wsp., 2013, Lin i wsp., 2014, Cheifetz i wsp., 1992 oraz <http://www.uniprot.org/uniprot/Q03167>); wyjaśnienie skrótów w tekście.

Domena zewnątrzkomórkowa betaglikanu podlega modyfikacjom potranslacyjnym. W jej obrębie występują dwa miejsca O-glikozylacji (Ser 535, 546) modyfikowane siarczanem heparanu lub chondroityny (GAG, ang. *glycosaminoglycans*) oraz pięć miejsc N-glikozylacji (Asp 142, 493, 572, 591, 698) (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q03167>; dostęp z dnia 10/11/2015). Modyfikacje potranslacyjne betaglikanu skutkują zróżnicowaniem mas cząsteczkowych dimerów betaglikanu w komórkach w przedziale 250-350 kDa (Cheifetz i wsp., 1988a; Lopez-Casillas i wsp., 1994). Modyfikacje glikozaminoglikanami nie mają bezpośredniego wpływu na zdolność betaglikanu do wiązania czynników TGFβ, natomiast w istotny sposób wpływają na formowanie kompleksu z receptorami TGFβ typu I oraz typu II, hamując odpowiedź komórkową na sygnalizację TGFβ. Glikozaminoglikany umożliwiają także oddziaływanie betaglikanu z czynnikiem wzrostu fibroblastów bFGF (Andres i wsp., 1991; Eickelberg i wsp., 2002; Lopez-Casillas i wsp., 1994). Sugeruje się, że przyłączanie GAG do betaglikanu znajduje się pod pozytywną kontrolą onkogenu *KRAS* (ang. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), prowadząc do nasilenia proliferacji komórek w odpowiedzi na stymulację izoformą TGFβ1, co wykazano w przypadku komórek raka jelita grubego lini HD6-4. Zwiększona proliferacja wydaje się być bezpośrednim rezultatem obniżenia ekspresji białka p21^{Cip1} będącego inhibitorem kinaz zależnych od cyklin (Cdk, ang. cyclin-dependent kinase) oraz supresorowej fosfatazy PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) (Yan i wsp., 2001).

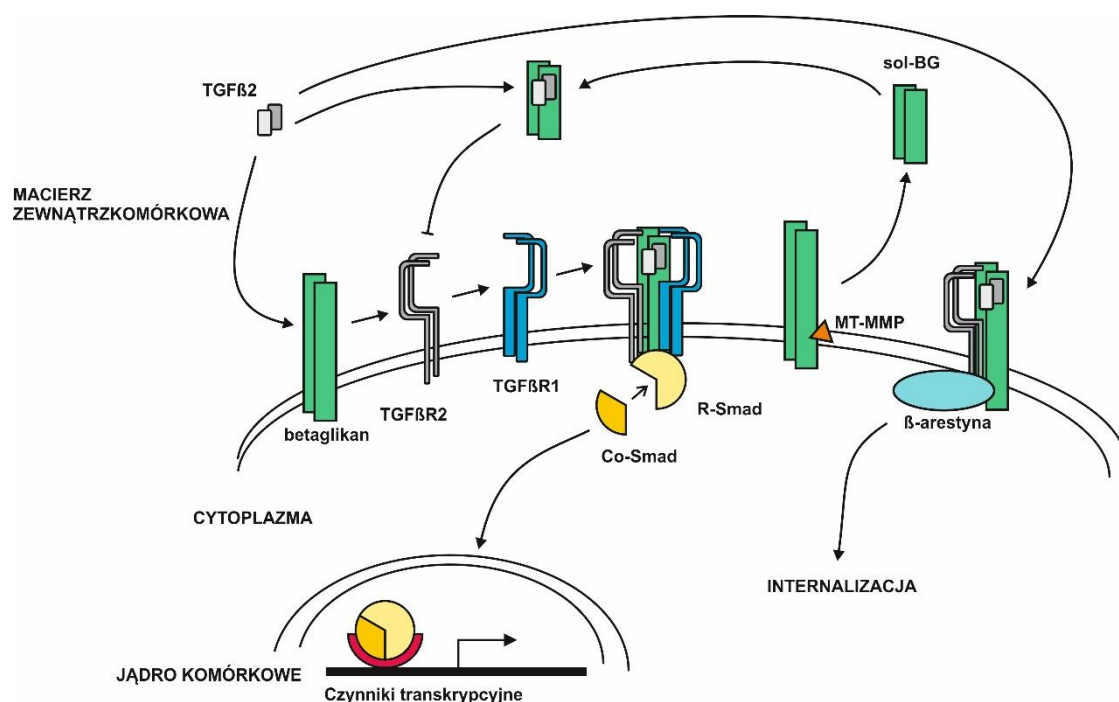
Domena cytoplazmatyczna betaglikanu liczy tylko 42 reszty aminokwasowe i pozbawiona jest jakiegokolwiek znanego motywu o aktywności kinazowej. Chociaż nie jest ona zaangażowana w prezentację czynników TGFβ ich receptorom, pełni istotną rolę w pośredniczonej przez betaglikan regulacji sygnalizacji TGFβ. Domena cytoplazmatyczna betaglikanu na C-końcu zawiera trójaminokwasowy motyw STA (Ser-Thr-Ala) należący do I klasy motywów rozpoznawanych przez domenę białek PDZ (PSD95/Dlg1/ZO-1). Obecność motywu wiążącego domenę PDZ warunkuje oddziaływanie betaglikanu z białkiem GIPC (ang. *GAIP [G alpha interacting protein]-interacting protein, C terminus*), prowadząc do stabilizacji betaglikanu w błonie komórkowej oraz nasilenia jego ekspresji. Rezultatem, tego jest zwiększona odpowiedź na sygnalizację TGFβ, co stwierdzono w warunkach

in vitro w przypadku komórek zwierzęcych linii Mv1Lu i L6, mysich komórek epikardialnych oraz podczas rozwoju struktur serca w modelu ptasim. (Blobe i wsp., 2001; Hill i wsp., 2012; Sanchez i wsp., 2011; Townsend i wsp., 2012). Jednak, modulowanie sygnalizacji TGF β za pośrednictwem białka GIPC wydaje się być uzależnione od rodzaju i/lub stanu fizjologicznego komórek, w których ma ono miejsce. Jak zaobserwowano w przypadku linii komórkowej raka gruczołu mlekowego myszy 4T1, interakcja betaglikan-GIPC skutkowała zahamowaniem kanonicznej sygnalizacji zachodzącej przy udziale białek Smad. Sugeruje się, że mechanizm ten może być wynikiem internalizacji betaglikanu, w której pośredniczy β -arestyna 2 (Lee i wsp., 2010). Arestyny należą do białek zaangażowanych w regulację szlaków sygnalizacyjnych aktywowanych za pośrednictwem receptorów oddziałujących z białkami G (GPCR, *ang. G-protein coupled receptors*). Odpowiedzialne są one za desensytyzację oraz internalizację aktywowanych przez kinazy GRKs (*ang. G protein-coupled receptor kinases*) siedmiotransmembranowych receptorów GPCR (Kovacs i wsp., 2009). Podobny mechanizm obserwowany jest również w przypadku betaglikanu. Proces internalizacji zależnej od β -arestyny 2 zachodzi w wyniku fosforylacji betaglikanu na reszcie treoniny 841 przez aktywowany receptor TGF β R2. Powstały kompleks β -arestyna 2/TGF β R2/betaglikan ulega translokacji do cytoplazmy, a obserwowana endocytoza zachodzi w głównej mierze przy udziale tratw lipidowych (*ang. lipid rafts*), choć może ona też mieć miejsce przy udziale klatryny. Podczas endocytozy klatryno-zależnej internalizacji mogą również ulegać receptory TGF β typu I. Efektem obu mechanizmów jest brak aktywacji efektorowych białek R-Smad, co prowadzi do supresji sygnalizacji TGF β (**Ryc. 1.6.**) (Chen i wsp., 2003b; Finger i wsp., 2008a; McLean i Di Guglielmo, 2010).

Istotne znaczenie w przekazywaniu sygnału z udziałem betaglikanu odgrywa również rozpuszczalna forma betaglikanu sol-BG (*ang. soluble betaglycan*) o m.cz. 100-120 kDa i mająca postać niekowalencyjnie połączonych homodimerów. Powstaje ona w wyniku proteolitycznego odcięcia domeny zewnątrzkomórkowej betaglikanu zlokalizowanego w błonie komórkowej i pełni funkcję antagonistyczną względem receptorów TGF β , współzawodnicząc z nimi o czynniki TGF β (**Ryc. 1.5, 1.6.**) (Vilchis-Landeros i wsp., 2001). Sol-BG gromadzi się w macierzy zewnątrzkomórkowej, jednak może występować również

w surowicy oraz wydzielinie gruczołów mlecznych (Andres i wsp., 1989; Cheung i wsp., 2003). Uwalnianie rozpuszczalnej formy betaglikanu wydaje się mieć charakter konstytutywny, ponieważ jej ilość zdeponowana w ECM jest proporcjonalna do poziomu ekspresji betaglikanu zlokalizowanego w błonie komórkowej. Jednakże mechanizm regulujący stężenie sol-BG w macierzy zewnątrzkomórkowej nie jest do końca poznany. W przeciwieństwie do innych znanych receptorów błonowych, dla których poznano mechanizmy uwalniania ich fragmentów zewnątrzkomórkowych, generowanie rozpuszczalnego betaglikanu ma zdecydowanie odmienny mechanizm. Uwalnianie sol-BG do ECM nie zachodzi pod wpływem, m.in. estrów forbolu, jonoforów wapniowych, czynników wzrostu, toksyn bakteryjnych lub stresu komórkowego (Arribas i Borroto, 2002; Hayashida i wsp., 2010). Badania Velasco-Loyden (2004) wykazały, że przezbłonowa postać betaglikanu ulega proteolitycznemu cięciu, modulowanemu przez ortowanadan sodu, będący inhibitorem fosfataz tyrozynowych, przy udziale metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej MT1-MMP i/albo MT3-MMP (*ang. membrane-type matrix metalloproteinases*) (**Ryc. 1.6.**). Podczas takiej proteolizy generowana jest również forma sol-BG o m. cz. 90 kDa. (Velasco-Loyden i wsp., 2004). Ponadto, wykazano, że plazmina, której zwiększoną aktywację obserwuje się podczas odpowiedzi zapalnej, odpowiedzialna jest za proteolizę rozpuszczalnej formy betaglikanu, tym samym znosząc jego funkcję antagonistyczną względem receptorów TGF β . Sekwencja aminokwasowa rozpoznawana przez plazminę występuje pomiędzy domenami E oraz ZP betaglikanu w obrębie odcinka łącznikowego (Mendoza i wsp., 2009). Jednocześnie zakotwiczona w błonie komórkowej domena cytoplazmatyczna betaglikanu, pozostała po uwolnieniu domeny zewnątrzkomórkowej stanowi substrat dla γ -sekretazy, będącej proteinazą błonową zaangażowaną w przetwarzanie lub aktywację białek przezbłonowych uczestniczących w różnych szlakach sygnalizacyjnych, takich jak NOTCH, E-kadheryna, ErbB4 oraz CD44 (Zhang i wsp., 2014b). W przypadku domeny cytoplazmatycznej betaglikanu sugeruje się, że na skutek działania γ -sekretazy może ona być odpowiedzialna za aktywację niekanonicznych kaskad komórkowych lub po translokacji do jądra komórkowego pełnić funkcję koregulatora transkrypcji. Jednakże, ta druga funkcja nie wydaje się być w pełni uzasadniona, ponieważ w domenie wewnątrzkomórkowej betaglikanu

nie identyfikuje się sekwencji lokalizacji jądrowej NLS (*ang. nuclear localization sequence*) (Blair i wsp., 2011).



Rycina 1.6. Udział betaglikanu w transdukcji sygnału indukowanego izoformą TGFβ2 (zmodyfikowano na podstawie Gatza i wsp., 2010); wyjaśnienie skrótów w tekście.

Funkcja betaglikanu, w szlaku sygnalizacyjnym TGFβ nie jest w pełni jednoznaczna i nieuzasadnionym wydaje się sprowadzanie jego udziału wyłącznie do roli prezentera czynników TGFβ ich natywnym receptorom. Oddziaływanie betaglikanu z różnymi komponentami komórkowymi wskazuje na znacznie istotniejszą funkcję niż sądzono pierwotnie. W szczególności warta podkreślenia jest jego rola jako kluczowego elementu odpowiedzialnego za modulowanie sygnalizacji TGFβ w komórce.

1.3. Udział szlaku sygnalizacyjnego TGFβ w transformacji nowotworowej

1.3.1. Paradoks sygnalizacji TGFβ w procesie nowotworzenia

Liczne badania dotyczące udziału kaskady TGFβ w procesie transformacji nowotworowej, m.in., prostaty, piersi, jajnika, płuca, jelita grubego, trzustki oraz melanocytów wskazują na plejotropowy charakter tej sygnalizacji (Cruz-Merino i wsp., 2009; Padua i Massague, 2009). Znaczenie szlaku TGFβ dla powstawania i rozwoju nowotworu nie ogranicza się wyłącznie do roli czynnika hamującego, czy propagującego rozwój guza, lecz jest znacznie szerszy i zależy ściśle od stopnia zaawansowania samego procesu nowotworzenia. Jak wykazały liczne badania, w początkowych etapach transformacji nowotworowej stymulacja TGFβ hamując wzrost i proliferację komórek sprzyja supresji powstającego guza. Odpowiedzialna jest ona za indukcję apoptozy oraz autofagii, ogranicza proces angiogenezy, a także hamuje procesy zapalne (Jakowlew, 2006; Massague, 2008; Zhang i wsp., 2014a). Jednakże wraz z postępem procesu nowotworowego ujawnia się jej plejotropowy charakter. W bardziej zaawansowanych stadiach transformacji nowotworowej szlak TGFβ przyjmuje rolę promującą rozwój guza, tym samym sprzyjając jego progresji i przerzutowaniu. Istotną funkcją czynników TGFβ jest wtedy ich zdolność do indukowania przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej EMT (*ang. epithelial-mesenchymal transition*), przebudowy ECM, hamowania odpowiedzi immunologicznej poprzez oddziaływanie na mikrośrodowisko guza (Cruz-Merino i wsp., 2009; Heldin i wsp., 2012; Inman, 2011; Morrison i wsp., 2013). Ta wyraźnie zaznaczona dualistyczna natura szlaku TGFβ w procesie transformacji nowotworowej określana jest w literaturze paradoksem TGFβ, a jego funkcja przyrównywana jest do „miecza obosiecznego”, czy „doktora Jekylla oraz Mr Hayde’a” (Akhurst i Derynck, 2001; Bieri i Moses, 2006; Principe i wsp., 2014; Wendt i wsp., 2012).

1.3.2. Szlak TGF β jako supresor procesu nowotworzenia

Efekt cytostatyczny

Sygnalizacja indukowana czynnikami TGF β jest jednym z głównych mechanizmów warunkujących supresję proliferacji różnych typów komórek. Aktywacja szlaku TGF β odpowiedzialna jest za zatrzymywanie podziałów komórkowych w późnej fazie G1. Zahamowanie cyklu komórkowego jest następstwem pośredniczonej przez kompleks białek Smad2/3-Smad4 oraz czynniki transkrypcyjne FOXO, Sp1 (*ang. specificity protein 1*) oraz C/EBP β (*ang. CCAAT enhancer binding protein*) ekspresji białek p15^{Ink4b} oraz p21^{Cip1} (Datto i wsp., 1995; Feng i wsp., 2000; Gomis i wsp., 2006a; Gomis i wsp., 2006b; Hannon i Beach, 1994; Seoane i wsp., 2004). Odpowiadają one za hamowanie kinaz zależnych od cyklin, tj. odpowiednio kompleksów Cdk4/6-cyklinaD oraz Cdk2-cyklinaE/A. Ponadto przyłączaniu inhibitora p15^{Ink4b} do kompleksu Cdk4-cyklinaD towarzyszy odłączanie inaktywującego białka p27^{Kip1}, które może również hamować aktywność kompleksu Cdk2-cykliny E/A. Ekspresja białek o funkcji inhibitorów cyklu komórkowego ma charakter tkankowo-specyficzny. Stymulacja TGF β prowadzi do ekspresji białek p21^{Cip1} i p27^{Kip1} w limfocytach T, białka p57^{Kip2} w komórkach hematopoetycznych, a białek p15^{Ink4b} and p21^{Cip1} w przypadku astrocytów oraz komórek progenitorowych układu nerwowego (Rich i wsp., 1999; Scandura i wsp., 2004; Seoane i wsp., 2004; Wolfrim i wsp., 2004). Jednocześnie wraz z nasileniem ekspresji inhibitorów kinaz Cdk, kaskada TGF β prowadzi do obniżenia ekspresji fosfatazy Cdc25 (*ang. cell division cycle protein 25*), która defosforylując kinazy zależne od cyklin w domenę wiązania ATP prowadzi do ich aktywacji (Rahimi i Leof, 2007).

Cykl komórkowy znajdujący się pod negatywną kontrolą szlaku TGF β jest dodatkowo modulowany za jego pośrednictwem na poziomie transkrypcyjnym. Sygnalizacja TGF β odpowiedzialna jest za represję genu kodującego czynnik transkrypcyjny c-Myc (*ang. myelocytomatosis viral oncogene homolog*), zaangażowany w promowanie proliferacji komórek, jak również hamowanie różnicowania z udziałem czynników transkrypcyjnych Id1-3 (Kang i wsp., 2003; Siegel i wsp., 2003). Obniżenie ekspresji białka c-Myc następuje dzięki aktywności kompleksu represorowego Smad-E2F4/5-C/EBP β rozpoznającego w sekwencji

promotorowej genu *MYC* element regulatorowy TIE (*ang. TGF β inhibitory element*). Hamowanie ekspresji białka c-Myc indukuje równocześnie biosyntezę inhibitora p15^{Ink4b} na skutek uwalniania czynnika Miz-1 (*ang. Myc-interacting zinc-finger protein 1*), który tworząc kompleks transkrypcyjny z białkami Smad3/4 rozpoznaje specyficzną sekwencję SBE w genie kodującym białko p15^{Ink4b} (Gomis i wsp., 2006b; Siegel i Massague, 2003). Natomiast za obniżenie ekspresji inhibitora różnicowania Id1 odpowiada czynnik ATF3 (*ang. activating transcription factor 3*) hamujący aktywność transkrypcyjną białek Smad (Kang i wsp., 2003).

Ograniczanie podziałów komórkowych za pośrednictwem stymulacji TGF β odbywa się również na poziomie translacji. W mechanizmie tym istotną rolę odgrywa Smad-niezależna sygnalizacja z udziałem jednego z receptorów typu I. Wykazano, że w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego myszy linii EpH4, aktywowany receptor TGF β R1 po związaniu się z podjednostką β fosfatazy 2A (PP2A, *ang. protein phosphatase 2A*) prowadzi do defosforylacji i inaktywacji kinazy p70^{s6K} (*ang. protein 70 kDa ribosomal protein s6 kinase*), należącej do kinaz efektorowych szlaku PI3K/Akt (Griswold-Prenner i wsp., 1998; Petritsch i wsp., 2000). Kinaza ta odpowiedzialna jest m.in. za rekrutowanie białek uczestniczących w tworzeniu rybosomów, stąd zahamowanie jej aktywności skutkuje brakiem biosyntezy białek i w konsekwencji zatrzymaniem cyklu komórkowego (Sengupta i wsp., 2010).

Indukcja apoptozy

Równie istotnym procesem modulowanym sygnalizacją TGF β , mającym kluczowe znaczenie dla supresji nowotworzenia jest apoptoza. Apoptozę indukowaną czynnikami TGF β obserwuje się zwłaszcza w trakcie rozwoju embrionalnego, homeostazy tkankowej, jak również w stanach patologicznych, w tym transformacji nowotworowej (Fleisch i wsp., 2006; Heldin i wsp., 2009; Wu i Hill, 2009). Kim i wsp. (2004) wykazali, że stymulacja czynnikiem TGF β 1 odpowiada za kierowanie komórek raka żołądka linii SNU-620 na drogę apoptozy na skutek aktywowanej białkami Smad3 ekspresji powierzchniowych receptorów FasR (*ang. TNF receptor superfamily, member 6*), które aktywują kaspazę 8 w sposób niezależny od ligandów FasL (*ang. Fas ligand*) (Kim i wsp., 2004).

Identyczny mechanizm obserwowany jest dla komórek chłoniaka Burkitta, podczas gdy stymulacja czynnikiem TGFβ1 komórek nabłonka oskrzeli uruchamia apoptozę w wyniku aktywacji kaspazy 3 (Hagimoto i wsp., 2002; Inman i Allday, 2000). Odmienny mechanizm aktywacji apoptozy ma miejsce w komórkach raka wątroby linii Hep3B, w których w indukcji apoptozy pośredniczy kinaza DAPK (*ang. death associated protein kinases*) (Jang i wsp., 2002).

Liczne badania wskazują na udział szlaku PI3K/Akt jako regulatora programowanej śmierci komórki indukowanej czynnikami TGFβ (Zhang i wsp., 2013). Sygnalizacja PI3K/Akt prowadzi do zniesienia proapoptotycznej aktywności TGFβ na skutek aktywacji kinazy mTOR (*ang. mammalian target of rapamycin*). Regulacja ta odbywa się na poziomie fosforylacji białek Smad. Fosforylacja kinazy Akt przez kinazę PI3K umożliwia wiązanie się nieaktywnego białka Smad3, tym samym zapobiega jego aktywacji za pośrednictwem receptora TGFβR1. Związanie białek Smad3 przez Akt uniemożliwia formowanie heteromerycznego kompleksu Smad3-Smad4, jego translokacji do jądra komórkowego, w następstwie czego dochodzi do zablokowania zależnej od białek Smad apoptozy. Ponadto aktywność kinazy Akt prowadzi również do zahamowania ekspresji białek jądrowych niezbędnych do propagacji sygnalizacji pochodzącej od białek Smad (Conery i wsp., 2004; Remy i wsp., 2004). Znaczenie sygnalizacji PI3K/Akt w hamowaniu apoptozy indukowanej czynnikami TGFβ odgrywa istotną rolę w przypadku nowotworów, w których dochodzi do inaktywacji fosfatazy PTEN (*ang. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom ten*). Zaobserwowano to przypadku komórek raka prostaty, gdzie równoczesne zablokowanie ekspresji PTEN oraz Smad4 prowadziło do nabycia przez komórki zdolności do inwazji i przerzutowania (Ding i wsp., 2011). Wydaje się, że inhibicja apoptozy w PTEN-negatywnych komórkach raka prostaty ma związek z zahamowaniem ekspresji genów zależnych od sygnalizacji TGFβ na drodze transkrypcyjnej represji pośredniczonej przez czynnik COUP-TFII (*ang. chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor 2*). Czynnikiem ten jest receptorem jądrowym specyficznym dla progresji i przerzutowania raka prostaty, hamującym aktywność transkrypcyjną białka Smad4 (Qin i wsp., 2013).

Kolejnym mechanizmem regulacji apoptozy indukowanej za pośrednictwem szlaku TGF β jest oddziaływanie na ekspresję białek rodziny Bcl-2 (*ang. apoptosis regulator B-cell lymphoma 2 family*) (Chipuk i wsp., 2001; Francis i wsp., 2000; Motyl i wsp., 1998; Ohgushi i wsp., 2005; Ramjaun i wsp., 2007; Yano i wsp., 2006). Rodzina Bcl-2 stanowi liczną grupę białek zaangażowanych w regulację apoptozy. Należą do niej zarówno białka wykazujące działanie pro-, jak i anty-apoptotyczne, a wzajemne interakcje między nimi zależnie od osiągniętego stanu równowagi warunkują indukcję, bądź supresję programowanej śmierci komórek (Czabotar i wsp., 2014; Moldoveanu i wsp., 2014; Rogalińska i Kiliańska, 2012). Z punktu widzenia szlaku TGF β istotne znaczenie dla regulacji apoptozy odgrywa hamowanie ekspresji anty-apoptotycznego białka Bcl-xL (*ang. B-cell lymphoma-extra large*), jak dowiedziono tego w przypadku komórek raka prostaty (Chipuk i wsp., 2001). Nadekspresja białka Bcl-xL prowadził do zniesienia apoptozy indukowanej czynnikami TGF β . Obserwowanemu zahamowaniu apoptozy nie towarzyszyło jednak zatrzymanie podziałów komórkowych. Jednocześnie, jak wykazano, kanoniczny szlak TGF β odpowiedzialny jest za wzmożoną ekspresję pro-apoptotycznych białek Bim (*ang. Bcl-2 interacting mediator of cell death*) oraz Bmf (*ang. Bcl-2 modifying factor*), należących do podrodziny "BH-3 only". Indukcja ekspresji białek Bim i Bmf może również zachodzić w wyniku niekanonicznej sygnalizacji TGF β na skutek aktywacji kinazy aktywowanej mitogenami p38 (Ohgushi i wsp., 2005; Ramjaun i wsp., 2007). Czynnikiem transkrypcyjnym uczestniczącym w regulacji ekspresji pro-apoptotycznych białek Bim i Bmf rodziny Bcl-2 jest oddziałujący z białkami Smad czynnik RUNX3, wiążący się z sekwencjami regulatorowymi zlokalizowanymi w regionach promotorowych genów kodujących białka Bim i Bmf (Yano i wsp., 2006).

Poza indukcją apoptozy zależną od białek Smad, sygnalizacja TGF β może kierować komórki na drogę programowanej śmierci komórki za pośrednictwem innych szlaków komórkowych. Receptory TGF β typu II poza fosforylacją receptora TGF β R1 mogą pośredniczyć w sygnalizacji MAPK. Stymulacja ligandami TGF β prowadzi do aktywacji szlaku kinaz MAPK w wyniku oddziaływania receptora TGF β R2 z białkiem adaptorowym DAXX (*ang. death-associated protein*). Białko to następnie ulegając fosforylacji przez kinazę HIPK2 (*ang. homeodomain-*

interacting protein kinase 2) indukuje apoptozę za pośrednictwem kinaz MKK4/7 (Hofmann i wsp., 2003; Perlman i wsp., 2001). Sygnalizacja TGFβ może również indukować apoptozę na drodze zależnej od kinaz p38 oraz JNK za pośrednictwem kinazy TAK1 (*ang. transforming growth factor β-activated kinase 1*) należącej do rodziny kinaz MAPKKK (*ang. mitogen-activated protein kinase kinase kinase*). Aktywacja ta ma miejsce w wyniku rekrutacji przez kompleks receptorowy TGFβ aktywatorów kinazy TAK1, tj. HPK1 (*ang. hematopoietic progenitor kinase 1*), TAB1 oraz TAB2/3 (*ang. TAK1-binding protein 1/2/3*) (Kim i wsp., 2009; Mu i wsp., 2012; Rahimi i Leof, 2007; Wang i wsp., 1997). Ponadto w aktywację kinazy TAK1 zaangażowany jest czynnik TRAF6 (*ang. TNF receptor associated factor 6*) posiadający aktywność ligazy ubikwityny E3, który poza swą główną funkcją w sygnalizacji pochodzącej od receptorów TNFRSF (*ang. tumor necrosis factor receptor superfamily*) oraz TLR (*ang. toll-like receptor*), moduluje przekazywanie sygnału z receptorów TGFβ na szlak kinaz MAPK (Roh i wsp., 2014; Yamashita i wsp., 2008). Czynnik TRAF6 na skutek interakcji z sekwencją najwyższej zgodności (aminokwas zasadowy)-X-Pro-X-Glu-X-X-(aminokwas aromatyczny/kwaśny) receptora TGFβR1 ulega autoubikwitylacji, co prowadzi do uruchomienia apoptozy za pośrednictwem sygnalizacji TAK1-p38/JNK (Sorrentino i wsp., 2008; Yamashita i wsp., 2008).

1.3.3. Szlak TGFβ jako promotor progresji i przerzutowania nowotworów

Supresja odpowiedzi immunologicznej

Jednym z kluczowych mechanizmów odpowiedzialnych za progresję transformacji nowotworowej jest supresja odpowiedzi immunologicznej. W warunkach fizjologicznych intensywnie dzielące się komórki nowotworowe, którym udało się „uciec” spod mechanizmów kontrolujących proliferację oraz uniknąć apoptozy powinny zostać wyeliminowane przez odpowiednie komponenty układu odpornościowego. Jednakże okazuje się, że w większości typów raka równocześnie dochodzi do osłabienia tego rodzaju odpowiedzi, co jest związane między innymi z sygnalizacją inicjowaną czynnikami z rodziny TGFβ (Lippitz, 2013). Stwierdza się zaangażowanie szlaku TGFβ w utrzymanie homeostazy poprzez promowanie różnicowania odpowiednich populacji komórek

układu odpornościowego. Sygnalizacja TGF β zaangażowana jest w modulowanie różnicowania oraz dojrzewania szerokiego spektrum komórek odpornościowych, zarówno odpowiedzi wrodzonej, jak i nabytej, w tym komórek NK (*ang. natural killers*), komórek dendrytycznych (DCs, *ang. dendritic cells*), makrofagów (Mf, *ang. macrophages*), neutrofilów (Nf, *ang. neutrophils*) oraz limfocytów T. Jednocześnie szlak TGF β , a dokładniej sekrecja jego ligandów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej ma istotny wpływ na mikrośrodowisko nowotworów (*ang. tumor microenvironment*) oraz wytwarzanie tolerancji immunologicznej (Schon i Weiskirchen, 2014; Starska i Brzezińska-Błaszczyk, 2010; Travis i Sheppard, 2014; Yang i wsp., 2010;).

Spośród komponentów układu immunologicznego czynniki TGF β wywierają największy wpływ na limfocyty T. Jak wykazały jedne z pierwszych badań dotyczących znaczenia TGF β w odpowiedzi komórkowej, stymulacja czynnikami TGF β prowadzi do zahamowania *in vitro* proliferacji limfocytów grasicozależnych T zarówno CD4⁺ jak i CD8⁺ (Kehrl i wsp., 1986). Potwierdziły to eksperymenty na modelu zwierzęcym, w którym wyciszenie ekspresji izoformy TGF β 1, bądź receptorów TGF β R1 lub TGF β R2 u myszy, powodowało przedwczesną śmierć w związku z hiperreaktywnością układu immunologicznego, a zwłaszcza z wzmożoną proliferacją limfocytów T (Gorelik i Flavell, 2000; Kulkarni i wsp., 1993; Liu i wsp., 2008; Marie i wsp., 2006; Shull i wsp., 1992). Sygnalizacja TGF β odpowiedzialna jest za hamowanie sekrecji interleukiny 2 (*IL-2*, *ang. interleukin-2*) w sposób zależny od białek Smad2/Smad3 oraz korespresora Tob. IL-2 jest kluczową cytokiną warunkującą proliferację limfocytów T. Równocześnie stymulacja TGF β prowadzi do obniżenia ekspresji czynnika transkrypcyjnego c-Myc oraz zwiększonej ekspresji inhibitorów kinaz zależnych od cyklin tj. p15^{Ink4b}, p21^{Cip1} oraz p27^{Kip1}, co skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego (Li i wsp., 2006; Teicher, 2007; Travis i Sheppard, 2014; Wrzesinski i wsp., 2007). Mechanizm regulacji odpowiedzi adaptacyjnej za pośrednictwem szlaku TGF β podlega zależnej od białek Smad supresji zarówno proliferacji oraz różnicowania komórek T, zwłaszcza subpopulacji limfocytów Th1 (*ang. T helper cells 1*) posiadających aktywność antynowotworową (Flavell i wsp., 2010; Li i Flavell, 2008).

Ponadto stymulacja naiwnych limfocytów T izoformami czynnika TGFβ prowadzi do odróżnicowania i nabycia w efekcie przez komórki fenotypu Treg (*ang. **regulatory T cell***). Czynnikiem niezbędnym to zajścia konwersji naiwnych limfocytów T w komórki Treg jest inicjowana sygnalizacją TGFβ indukcja ekspresji czynnika transkrypcyjnego FOXP3 (Chen i wsp., 2003a; Tone i wsp., 2008). Limfocyty Treg warunkują w głównej mierze supresję odpowiedzi immunologicznej przyczyniając się do rozwoju tolerancji immunologicznej w mikrośrodowisku guza, która także podlega regulacji przez sygnalizację TGFβ (Pickup i wsp., 2013; Vignali i wsp., 2008; von i Daniel, 2013). Natomiast do odróżnicowania naiwnych limfocytów T w limfocyty Th17 dochodzi w wyniku równoczesnej stymulacji TGFβ oraz IL-6 (*ang. **interleukin-6***). Ma ono miejsce na skutek aktywacji ekspresji receptora jądrowego RORγt (*ang. **retinoic-acid-receptor-related orphan receptor-γt***) z jednoczesną supresją czynnika transkrypcyjnego FOXP3 (Ivanov i wsp., 2006). Cechą charakterystyczną limfocytów linii Th17 jest sekrecja IL-17 (*ang. **interleukin-17***), która odpowiada za indukcję procesów angiogenezy oraz proliferacji komórek nowotworowych. Jednakże odpowiedź ta uzależniona jest od stanu immunologicznego organizmu i może mieć charakter hamujący progresję guza w przypadku prawidłowo funkcjonującego układu odpornościowego (Kryczek i wsp., 2009b). Ponadto limfocyty Th17 mogą promować rozwój nowotworu poprzez rekrutację neutrofilów oraz stymulowanie ich w kierunku odróżnicowania do mniej cytotoksycznego fenotypu N2, a także indukowania sekrecji IL-6 (Hanahan i Weinberg, 2011; Hunter i Jones, 2015; Kryczek i wsp., 2009a; Mills, 2008; Tu i wsp., 2014; Whiteside, 2012).

Kaskada TGFβ odgrywa równie istotną funkcję w przypadku wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Odpowiedzialna jest między innymi za regulowanie rekrutacji, aktywację oraz warunkowanie funkcji komponentów układu immunologicznego odpowiedzialnych za rozpoznanie i eliminację antygenów nowotworowych (Flavell i wsp., 2010; Gigante i wsp., 2012). Kluczową funkcją sygnalizacji TGFβ w modulowaniu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej jest jej zaangażowanie w proces polaryzacji makrofagów M2. Komórki M2 w przeciwieństwie do populacji M1 należą do alternatywnie aktywowanych makrofagów. Ich fenotyp odpowiada makrofagom swoistym dla nowotworów TAM

(ang. *tumor-associated macrophages*) i charakteryzuje się niską ekspresją cytokin prozapalnych, tj. TNF- α , IL-6 oraz sekrecją znacznych ilości białek przeciwzapalnych w tym IL-10 oraz TGF β . Ponadto sprzyjają one progresji nowotworów na skutek nasilonej ekspresji czynnika wzrostu komórek śródbłónka naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) oraz stymulowaniu aktywacji limfocytów Treg (Solinas i wsp., 2009). Obecność makrofagów TAM, skorelowaną z gorszym rokowaniem, stwierdza się w przypadku nowotworów płuc, piersi, prostaty, a także w chłoniaku Hodgkina (Lewis i Pollard, 2006; Steidl i wsp., 2010). Jak wykazały badania prowadzone na modelu mysim, selektywne wyciszenie ekspresji receptora TGF β R2 w komórkach hematopoetycznych prowadziło do zahamowania różnicowania makrofagów o fenotypie M2 (Gong i wsp., 2012). Potwierdzeniem tego faktu są badania *in vivo*, w których zahamowanie aktywności receptora TGF β R1 wraz z równoczesną stymulacją receptora TLR7 (ang. *toll-like receptor 7*) prowadziło u myszy do przeprogramowania makrofagów TAM w komórki o fenotypie M1 (Peng i wsp., 2013).

Podobnie do stymulowania makrofagów, ekspozycja na czynniki z rodziny TGF β odpowiada za odróżnicowanie neutrofilów, faworyzując ujawnianie się fenotypu N2, który wykazuje zdecydowanie słabszą aktywność przeciwnowotworową. Wiąże się to z aktywacją ekspresji czynników promujących rozwój guza, tj. metaloproteinazy MMP9, chemokiny CXCL1 (ang. *C-X-C motif ligand 1*) oraz arginazy 1 (ARG1, ang. *arginase 1*) (Fridlender i wsp., 2009; Fridlender i Albelda, 2012).

Sygnalizacja TGF β hamuje również dojrzewanie komórek NK (ang. *natural killer cells*), których funkcją jest m. in. rozpoznawanie oraz usuwanie komórek nowotworowych (Marcoe i wsp., 2012). Jest to następstwem indukowanej czynnikami TGF β obniżonej ekspresji aktywującego komórki NK receptora NKG2D. Ponadto obserwuje się równocześnie obniżenie poziomu ekspresji cytokin, tj. IFN- γ oraz TNF- α (Vivier i wsp., 2008), co prowadzi do osłabienia cytotoksyczności komórek NK oraz działa hamująco na proces dojrzewania komórek dendrytycznych (ang. *dendritic cells*) oraz limfocytów Th1 (Laouar i wsp., 2005; Leavy, 2012; Novitskiy i wsp., 2012; Tanaka i wsp., 2010). Rezultatem tego jest

Sygnalizacja TGF β a angiogeneza

Wraz z postępem choroby nowotworowej i powiększaniem się masy guza, w komórkach nowotworowych rozwija się stan hipoksji, a także następuje wzrost stężenia toksycznych metabolitów oraz deficyt składników odżywczych. By temu zapobiec komórki nowotworowe wydzielając do mikrośrodowiska cytokiny wykazują zdolność indukowania procesu angiogenezy. Unaczynienie masy guza jest ważnym etapem nie tylko dla samego procesu wzrostu nowotworu, ale przede wszystkim odgrywa kluczową rolę w powstawaniu odległych przerzutów. Rozrastająca się nowa sieć naczyń krwionośnych stanowi drogę rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych w organizmie (Hanahan i Weinberg, 2011).

W trakcie procesu angiogenezy wyróżnić można dwa zasadnicze etapy. Pierwszy z nich to etap aktywacji (*ang. angiogenesis activation*), który obejmuje nasilenie proliferacji, migracji oraz inwazji sąsiadujących struktur przez komórki śródbłónka, a także zmniejszoną adhezję oraz integralność błony podstawnej naczyń krwionośnych. Drugi etap stanowi dojrzewanie formowanych naczyń krwionośnych (*ang. angiogenesis resolution*), na który składa się zwiększona adhezja komórek endotelialnych z jednoczesnym zahamowaniem ich proliferacji i ruchliwości, formowanie błony podstawnej, a także rekrutowanie komórek odpowiedzialnych za prawidłową hemodynamikę oraz stabilizujących ściany naczyń krwionośnych, tj. perycytów i komórek mięśni gładkich (Hagedorn i wsp., 2001; Lebrin i wsp., 2005; Tian i wsp., 2011). Sygnalizacja TGF β uczestniczy w obu wspomnianych etapach. Reguluje je zarówno auto-, jak i parakrynnie, współoddziałując z innymi mediatorami angiogenezy tj. czynnikami VEGF, bFGF, PDGF (*ang. platelet-derived growth factor*) oraz CTGF (*ang. connective tissue growth factor*), a także na zasadzie „cross-talk” ze szlakiem NOTCH (Bertolino i wsp., 2005; Holderfield i Hughes, 2008; Padua i Massague, 2009; Sakurai i Kudo, 2011; Sanchez-Elsner i wsp., 2001). Znaczenie sygnalizacji TGF β dla procesu angiogenezy wykazały liczne badania na modelach mysich, w których obserwowano malformacje naczyniowe powstające na skutek selektywnego hamowania ekspresji różnych komponentów kaskady TGF β , w tym izoformy TGF β 1, receptorów TGF β R1 oraz TGF β R2, receptorów pomocniczych betaglikanu

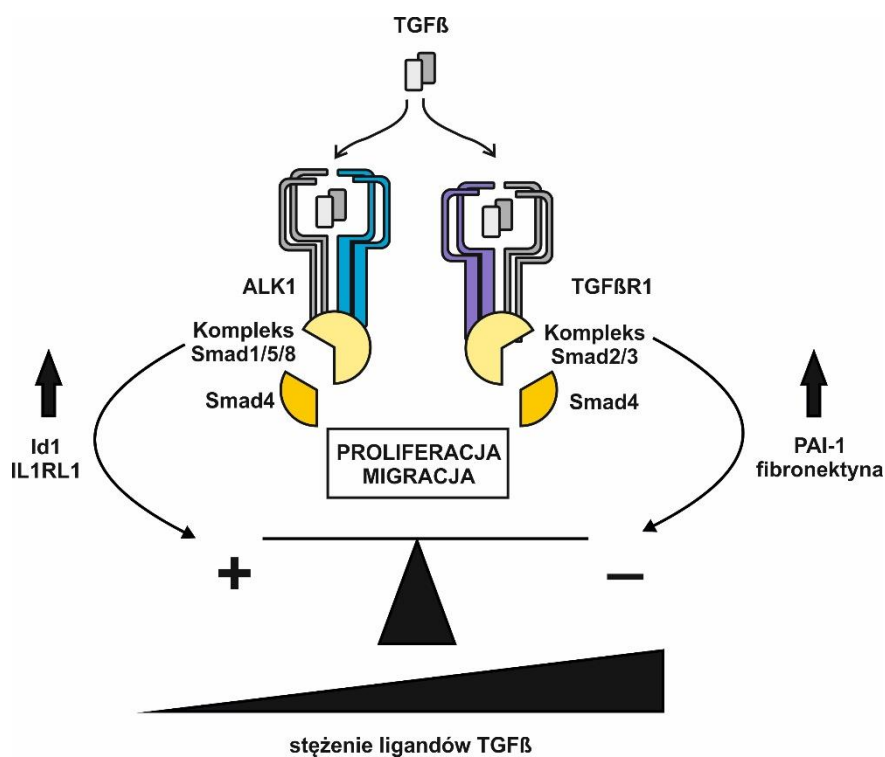
oraz endogliny, czy białek efektorowych Smad1 i Smad5 (Goumans i wsp., 2003a; Goumans i wsp., 2009; ten Dijke i Arthur, 2007).

Regulacja procesu angiogenezy za pośrednictwem szlaku TGF β odbywa się w głównej mierze przy udziale dwóch receptorów, tj. ALK1 oraz TGF β R1. W komórkach śródbłónka sygnalizacja z udziałem receptora ALK1 prowadzi do preferencyjnej fosforylacji kompleksu Smad1/5/8, podczas gdy receptor TGF β R1 aktywuje kompleks Smad2/3, przy czym efekt stymulacji każdego z receptorów jest przeciwny (Orlova i wsp., 2011; Principe i wsp., 2014). Aktywacja receptora ALK1 prowadzi do indukcji ekspresji inhibitora różnicowania Id1 (*ang. inhibitor of differentiation 1*) i receptora IL1RL1 (*ang. interleukin 1 receptor-like 1*), tj. białek promujących angiogenezę (Goumans i wsp., 2002; Goumans i wsp., 2003b; Lebrin i wsp., 2005; Ota i wsp., 2002; Wu i wsp., 2006). Natomiast sygnał przekazywany za pośrednictwem receptora TGF β R1 odpowiada za spoczynkowy fenotyp komórek śródbłónka, prowadząc do zahamowania ich proliferacji oraz migracji. Związane jest to ze zwiększoną ekspresją inhibitora aktywatora plazminogenu PAI-1 (*ang. plasminogen activator inhibitor type 1*) oraz fibronektyny, które odpowiadają za dojrzewanie naczyń krwionośnych. Białka te wykazują działanie angiostatyczne oraz stymulujące różnicowanie komórek periendotelialnych. Za rekrutację pericytów do dojrzewających naczyń krwionośnych odpowiada czynnik PDGF, którego ekspresja aktywowana jest czynnikami TGF β 1 (Holderfield i Hughes, 2008). Sygnalizacja z udziałem receptora TGF β R1 przyczynia się również do zwiększonej przepuszczalności komórek śródbłónka, co wykazano na modelu mysich embrionalnych komórek progenitorowych śródbłónka. Zastosowanie selektywnego inhibitora receptora TGF β R1 (SB-431542) powodowało zwiększoną ekspresję kładyny 5, jednego z białek adhezji komórkowej (Goumans i wsp., 2002; Goumans i wsp., 2003b; Lebrin i wsp., 2005; Watabe i wsp., 2003; Wu i wsp., 2006).

Znaczenie aktywacji receptorów ALK1 oraz TGF β R1 dla etapów procesu angiogenezy wydaje się być jednak dyskusyjne, ponieważ jak wykazano sygnalizacja za pośrednictwem receptora ALK1 może odpowiadać za etap dojrzewania naczyń krwionośnych, a nie za proces inicjacji angiogenezy (Lamouille i wsp., 2002; Oh i wsp., 2000; Shao i wsp., 2009). Obserwowana

rozbieżność może być następstwem zastosowania różnych modeli badawczych, a także udziałem innych ligandów z rodziny TGF β w stymulacji receptora ALK1, tj. czynników BMP4 oraz BMP9, bądź też zjawiskiem „cross-talk” ze szlakiem JNK i ERK, jako mediatorami odpowiedzi antyangiogennej (David i wsp., 2007; Shao i wsp., 2009)

Wypadkowy efekt aktywacji jednej z dwóch dróg przekazywania sygnału, ALK1 vs. TGF β R1, zależy ściśle od stężenia czynników z rodziny TGF β w mikrośrodowisku guza. Niskie stężenia tych białek promują aktywację za pośrednictwem receptora ALK1, podczas gdy ich wysokie stężenie przenosi ciężar sygnalizacji na receptor TGF β R1 (**Ryc. 1.8.**) (Lebrin i wsp., 2005; Orlova i wsp., 2011).



Rycina 1.8. Udział receptorów ALK1 i TGF β R1 w procesie angiogenezy (na podstawie Principe i wsp., 2014; Orlova i wsp., 2011); wyjaśnienie skrótów w tekście.

Niski poziom sekrecji czynników TGF β dodatkowo sprzyja proliferacji komórek endotelialnych poprzez indukcję ekspresji proangiogennych czynników VEGF (współoddziałując z czynnikiem HIF-1), bFGF oraz CTGF (Padua i Massague, 2009, Sanchez-Elsner i wsp., 2001; Shao i wsp., 2009; Siegel i Massague, 2003; Tian

i wsp., 2011). TGF β promuje również angiogenezę zwiększając migrację i inwazję komórek endotelialnych w wyniku nasilania sekrecji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-2 oraz MMP-9, przy równoczesnym hamowaniu ekspresji ich inhibitora TIMP (*ang. tissue inhibitor of metalloproteinases*), a także dzięki aktywowaniu ekspresji czynnika ANGPTL4 (*ang. angiopoetin-like protein 4*) (Ikushima i Miyazono, 2010; Padua i wsp., 2008; Perrot i wsp., 2013). Udział sygnalizacji TGF β w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej manifestuje się również poprzez indukując ekspresję fibronektyny, kolagenu typu I, IV i V oraz integryn $\alpha 5$ i $\beta 1$, co sprzyja oddziaływaniu naczyń krwionośnych z błoną podstawną (Fink i Boratyński, 2012; Holderfield i Hughes, 2008).

Efekt sygnalizacji TGF β dla angiogenezy zależy nie tylko od poziomu ekspresji czynników z rodziny TGF β , ale również oddziaływania z innymi ścieżkami przekazywania sygnału. Receptory ALK1 po aktywacji czynnikiem BMP-9 wykazują współoddziaływanie na poziomie transkrypcyjnym ze szlakiem NOTCH. Obecne w komórkach sąsiadujących z komórkami czołowymi proliferującego endotelium (*ang. stalk cells*) ufosforylowane białka efektorowe Smad1/5/8, tworząc kompleks transkrypcyjny z aktywną domeną NICD (*ang. notch intracellular domain*) receptora NOTCH odpowiedzialne są za aktywację ekspresji genów *HEY1*, *HEY2* oraz *JAGGED1*. Produkty tych genów będąc białkami efektorowymi szlaku NOTCH, warunkują zahamowanie dalszego kiełkowania komórek czołowych endotelium (*ang. tip cells*), stymulując tworzenie dojrzałych naczyń krwionośnych (Kerr i wsp., 2015; Larrivee i wsp., 2012; Moya i wsp., 2012).

2. Cel pracy

Liczne doniesienia wskazują na zaangażowanie w proces transformacji nowotworowej sygnalizacji inicjowanej transformującymi czynnikami wzrostu typu β (TGF β). Istotną rolę w tym szlaku sygnalizacyjnym odgrywa betaglikan należący do receptorów pomocniczych szlaku TGF β . Kodowany jest on przez gen *TGFBR3*, którego ekspresja znajduje się pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego GATA3. Główną funkcją betaglikanu jest prezentowanie ligandów receptorom TGF β o aktywności kinaz serynowo/treoninowych. Jak wykazały badania, w tym prowadzone w Katedrze Cytobiochemii UŁ, zaburzenia ekspresji receptorów pomocniczych TGF β mogą mieć związek z rozwojem i progresją nowotworów.

Celem pracy było poszukiwanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenie ekspresji betaglikanu, prowadzących w konsekwencji do nieprawidłowej inicjacji sygnalizacji TGF β zachodzącej przy udziale tego receptora pomocniczego w raku endometrium. Wywodzący się z komórek nabłonka gruczołowego błony śluzowej macicy rak endometrium stanowi ok. 80% przypadków nowotworów trzonu macicy. Zgodnie z danymi statystycznymi, liczba nowych przypadków zachorowania na raka endometrium zwiększa się corocznie, zajmując w Polsce czwartą pozycję wśród chorób nowotworowych u kobiet.

Realizacji postawionemu celowi służyły następujące zadania badawcze:

- ❖ ocena ekspresji betaglikanu na poziomie mRNA i białka
- ❖ ocena metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* kodującego betaglikan
- ❖ ocena ekspresji oraz metylacji genu kodującego czynnik transkrypcyjny GATA3 regulujący ekspresję betaglikanu
- ❖ ocena korelacji pomiędzy ekspresją i poziomem metylacji genów kodujących betaglikan i czynnik transkrypcyjny GATA3
- ❖ ocena utraty heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3*
- ❖ ocena wybranych polimorfizmów jednonukleotydowych w regionie promotorowym i kodującym genu *TGFBR3*.

3. Materiał

Ogółem w badaniach wykorzystano 133 preparaty raka endometrium, 69 preparatów prawidłowego endometrium oraz 248 preparatów krwi obwodowej kobiet, u których niezdiagnozowano choroby nowotworowej. Materiał kliniczny w liczbie 90 przypadków pierwotnego gruczolaka endometrium (*endometrioid adenocarcinoma*) oraz 69 preparatów prawidłowego endometrium pochodzących od pacjentek poddanych zabiegowi chirurgicznemu w latach 2010-2014 otrzymano z II Katedry i Kliniki Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie w ramach bezpośredniej współpracy z prof. dr hab. n. med. Andrzejem Semczukiem. Żadna z pacjentek przed zabiegiem chirurgicznym nie otrzymywała hormono-, chemio-, ani radioterapii. Bezpośrednio po zabiegu chirurgicznym materiał kliniczny dzielono na dwie porcje, z których jedną po utrwaleniu poddawano rutynowej ocenie histopatologicznej, drugą zaś po zamrożeniu w temperaturze -70°C przechowywano do dalszych badań. Analizowany materiał biologiczny był oceniany pod względem kliniczno-patologicznym, tj. typu histopatologicznego, stopnia zaawansowania klinicznego wg skali FIGO, stopnia histologicznej dojrzałości wg WHO (G), naciekania mięśniówki trzonu macicy (MI), zajęcia przestrzeni naczyniowych (VSI) oraz przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych. W **tabeli 3.1.** przedstawiono charakterystykę wykorzystanego w toku badań materiału klinicznego otrzymanego w ramach współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie. W badaniach polimorfizmu genu kodującego betaglikan wykorzystano również DNA z 43 przypadków raka endometrium oraz 248 preparatów krwi obwodowej kobiet, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej wyizolowany przez dr Ewę Formę (Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego) z materiału otrzymanego w ramach współpracy prof. dr hab. Magdaleny Bryś (Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego) z prof. dr. hab. Andrzejem Bieńkiewiczem oraz dr Katarzyną Wójcik-Krowirandą z Katedry Ginekologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Średnia wieku pacjentek z rakiem endometrium wynosiła 62,2 lat (mediana – 61 lat; min – 39 lat; max – 85 lat), a w przypadku grupy kontrolnej (krew) stanowiła odpowiednio 63,4 lat (mediana – 64 lat; min – 24 lata; max – 87 lat).

Wykorzystanie w badaniach materiału klinicznego zaakceptowane zostało przez Komisje Bioetyczne odpowiednio Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Tabela 3.1. Charakterystyka kliniczno-patologiczna analizowanego materiału pochodzącego z II Katedry Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

CHARAKTERYSTYKA		LICZBA PRZYPADKÓW
Wiek		
średnia		62
mediana		61
min – max		46 – 81
Stopień zaawansowania wg FIGO		
I		48
II		27
III		12
IV		3
Stopień złośliwości wg WHO		
G1		28
G2		49
G3		13
Naciekanie mięśniówki trzonu macicy (MI)		
<1/2 grubości mięśniówki		44
≥1/2 grubości mięśniówki		46
Zajęcie powierzchni naczyń (VSI)		
nienaciekające		70
naciekające		20
Zajęcie okolicznych węzłów chłonnych		
wolne		87
zajęte		0
nb		3

4. Metody

4.1. Izolacja RNA

Całkowity kwas rybonukleinowy (RNA) otrzymywano zgodnie ze skróconą metodą Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Rozdrobnioną tkankę zawieszano w 2 ml buforu denaturującego zawierającego: 4 M tiocyjanian guanidyny, 25 mM cytrynian sodu, 0,5 % sarkozyl, 0,1 M 2-merkaptoetanol i homogenizowano w ręcznym homogenizatorze nożowym w temperaturze 4°C. Do 600 µl homogenatu dodawano kolejno 60 µl 2 M octanu sodu (pH 4,0), 600 µl fenolu (pH 4,3) oraz 120 µl mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy (49:1, v/v). Próbkę po 15 minutowej inkubacji wirowano przez 20 minut przy 10 000 x *g* w temperaturze 4°C. Następnie zbierano fazę wodną, do której dodawano równą objętością alkoholu izopropylowego i pozostawiano na co najmniej 1 godzinę w temperaturze -20°C. Po precypitacji próbki wirowano przez 30 minut przy 10 000x*g* w 4°C. Osad RNA przepłukiwano dwukrotnie 75% alkoholem etylowym i zawieszano w 50 µl wody wolnej od RNaz, tj. traktowanej DEPC (*ang. diethylpyrocarbonate*). Preparaty przechowywano w temperaturze -70°C do dalszej analizy.

4.2. Izolacja DNA

Izolację kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) przeprowadzano metodą ekstrakcji fenolowej. Rozdrobnioną tkankę zawieszano w 750 µl buforu ekstrakcyjnego zawierającego: 10 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,5% SDS, homogenizowano w ręcznym homogenizatorze nożowym w temperaturze pokojowej i inkubowano przez ok. 12 godzin z 20 µl proteinazy K (10 mg/ml; A&A Biotechnology, Polska) w temperaturze 55°C. Następnie DNA ekstrahowano 750 µl mieszaniny fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (25:24:1, v/v/v). Po rozdzieleniu warstw w wyniku 30 minutowego wirowania przy 13 000x*g* w temperaturze pokojowej zbierano fazę wodną, z której wytrącano DNA za pomocą 750 µl alkoholu izopropylowego w obecności 75 µl 5 M octanu amonu w temperaturze 4°C przez co najmniej 30 minut. DNA odwirowywano przy 13 000x*g* i dwukrotnie przepłukiwano 70% alkoholem etylowym. Oczyszczony

DNA rozpuszczano w buforze TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) i przechowywano w temperaturze -70°C do dalszej analizy.

4.3. Spektrofotometryczna ocena jakościowa i ilościowa preparatów kwasów nukleinowych

Otrzymane preparaty RNA i DNA analizowano jakościowo oraz ilościowo za pomocą spektrofotometru BioPhotometer Plus (Eppendorf, Niemcy). Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fal λ_{260} oraz λ_{280} nm i wyznaczano stosunek wartości A_{260}/A_{280} . Do dalszej analizy wykorzystywano wyłącznie preparaty, dla których stosunek absorbancji A_{260} do A_{280} mieścił się w przedziale 1,8 – 2,0. Stężenie kwasów nukleinowych wyznaczano na podstawie zależności:

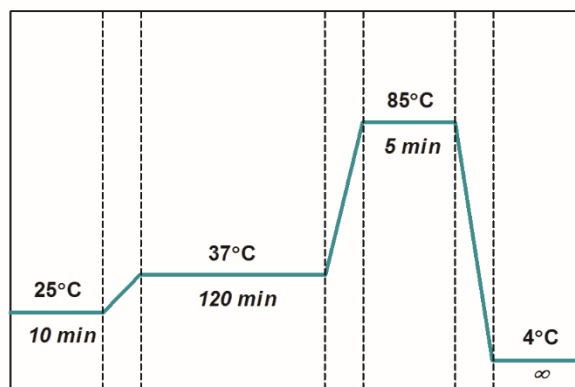
$$C_{\text{RNA}} [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40 [\mu\text{g/ml}] \mu\text{g} \times \text{rozcieńczenie}$$

$$C_{\text{DNA}} [\mu\text{g/ml}] = A_{280} \times 50 [\mu\text{g/ml}] \times \text{rozcieńczenie}$$

pod warunkiem, że długość drogi optycznej podczas pomiaru wynosiła 1 cm.

4.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji na matrycy wyizolowanego całkowitego RNA przeprowadzano przy użyciu komercyjnego zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) zgodnie z protokołem producenta. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono aparacie ThermalCycler 2720 (Applied Biosystems, USA) używając 1 μg całkowitego RNA w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 2 μl buforu reakcyjnego (10x), 0,8 μl mieszaniny dNTP (25x), 2 μl mieszaniny losowych oligonukleotydów (10x), 1 μl odwrotnej transkryptazy MultiScribe™ MuLV, 1 μl inhibitora RNaz. Całość uzupełniano wodą wolną od RNaz do końcowej objętości 20 μl . Profil termiczny reakcji odwrotnej transkrypcji przedstawiono na **rycinie 4.1.** Otrzymane w wyniku syntezy cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do dalszej analizy.



Rycina 4.1. Profil termiczny reakcji odwrotnej transkrypcji.

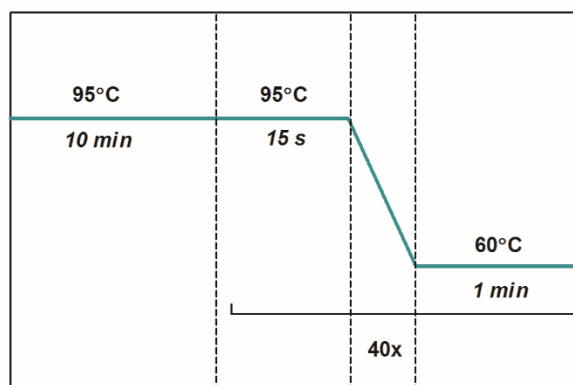
4.5. Analiza ilościowa przyrostu produktu łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR)

Analizę ilościową ekspresji badanych genów przeprowadzano z użyciem komercyjnych sond TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) znakowanych znacznikiem fluorescencyjnym 1FAM™ w obecności, zalecanego przez producenta sond, buforu reakcyjnego TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA). Analizę ilościową normalizowano wobec genu referencyjnego GPADH (*ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Zastosowano następujący zestaw sond: Hs00234259_m1 (gen *TGFBR3*), Hs00231122_m1 (gen *GATA3*) oraz Hs99999905_m1 (gen referencyjny *GAPDH*), specyficznych względem połączeń ekson-ekson, celem wykluczenia amplifikacji ewentualnych zanieczyszczeń matrycy genomowym DNA. Reakcję Real-time PCR prowadzano w całkowitej objętości 10 µl mieszaniny zawierającej 0,5 µl cDNA, 0,5 µl sondy TaqMan® Gene Expression Assay (20x), 5 µl buforu TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x) oraz 4 µl wody. Amplifikację wraz z pomiarem przyrostu produktu w czasie rzeczywistym dokonywano w aparacie Mastercycler® epgradient S realplex⁴ (Eppendorf, Niemcy) zgodnie w profilem termicznym wskazanym przez producenta i przedstawionym na **rycinie 4.2.**

Wartość względnej ekspresji badanych genów (L) wyznaczano za pomocą parametru C_t (*ang. cycle threshold*) przeliczając liczbę kopii mRNA badanego genu na 1000 kopii mRNA genu referencyjnego według wzoru:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ genu badanego}} - C_{t \text{ GAPDH}}$$

$$L = 2^{-\Delta C_t} \times 1000$$



Rycina 4.2. Profil termiczny reakcji Real-time PCR.

4.6. Otrzymywanie homogenatów tkankowych

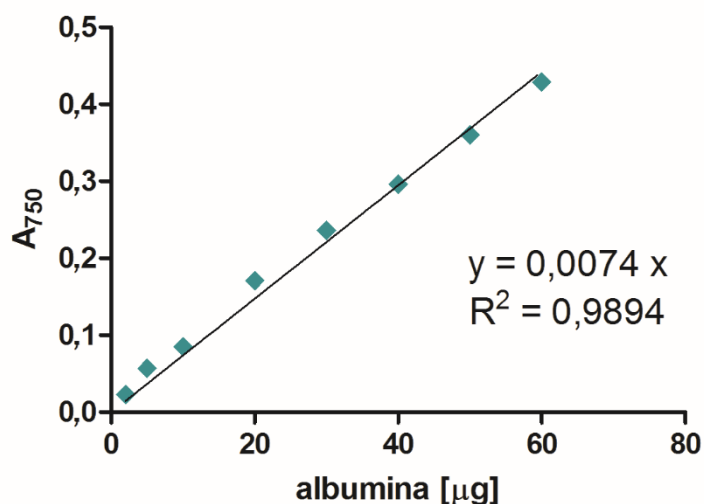
Lizaty tkankowe przygotowywano w buforze zawierającym: 0,25 M sacharozę, 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100, 1 mM PMSF. Tkanki homogenizowano w ręcznym homogenizatorze nożowym w temperaturze 4°C, a efektywność homogenizacji sprawdzano mikroskopowo stosując wybarwienie błękitem metylenowym. Próbkę homogenatów wirowano w 4°C przy 10 000xg przez 10 minut i przechowywano w -20°C do dalszej analizy.

4.7. Analiza ilościowa białka

Stężenie białka w otrzymanych homogenatach tkankowych wyznaczono przy zastosowaniu metody Lowry'ego i wsp. (1951). W tym celu pobierano 10 µl homogenatu i uzupełniano wodą do 200 µl. Następnie dodawano 200 µl 1M NaOH i inkubowano przez 20 minut. Po tym czasie dodawano 2 ml odczynnika miedziowego składającego się z 2% Na₂CO₃, 1% CuSO₄ oraz 2% winianu sodowo-potasowego, zmieszanych w stosunku 100:1:1, co najmniej 30 minut przed użyciem. Próbkę z odczynnikiem miedziowym inkubowano 10 minut, następnie dodawano 200 µl odczynnika Folina-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Niemcy), rozcieńczonego uprzednio wodą w stosunku 1:1, energicznie mieszano i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali λ₇₅₀. Pomiar absorbancji wykonywano przy użyciu

aparatu Helios β (Pye-Unicam, Wielka Brytania). Oznaczenie zawartości białka w próbach wykonywano w trzech powtórzeniach wobec kontroli negatywnej.

Stężenie białka w próbach odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla albuminy surowicy bydlęcej (Sigma-Aldrich, Niemcy) w zakresie 2 – 60 μg białka w próbce (**Ryc. 4.3.**).



Rycina 4.3. Krzywa wzorcowa stosowana do oznaczania ilości białka metodą Lowry'ego.

4.8. Immunodetekcja białek techniką Western blot

Przygotowanie próbek białkowych

Doprowadzone do stężenia 1,33 mg/ml białka próbki homogenatów tkankowych mieszano w stosunku 3:1 z buforem do rozpuszczania białek zawierającym 250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 8% SDS, 20% glicerol, 20% 2-merkaptioetanol oraz 0,01% pironinę. Uzyskane próbki o stężeniu 1 mg/ml inkubowano w temperaturze 100°C przez 5 minut, po czym schładzano i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszej analizy.

Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym

Elektroforezę białek w żelu poliakrylamidowym przeprowadzano zgodnie z protokołem Laemmliego (1970) w 7,5% żelu rozdzielającym o wymiarach 10 x 10 x 0,02 cm, zawierającym 0,1% SDS oraz 375 mM Tris/HCl (pH 8,8). Próbki białek o objętości 45 μl wstępnie zatężano w 3% żelu poliakrylamidowym

zawierającym 0,1% SDS oraz 125 mM Tris/HCl (pH 6,8). Elektroforezę przeprowadzano w układzie buforującym 192 mM glicyna, 25 mM Tris (pH 8,3), 0,1% SDS przy natężeniu 30 mA/płytkę w żelu zatężającym oraz 60 mA/płytkę w żelu rozdzielającym. Masę cząsteczkową rozdzielanych elektroforetycznie białek określano na podstawie wzorca mas cząsteczkowych Perfect™ Color Protein Ladder (7-240 kDa; EURx, Polska).

Elektrotransfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę

Rozdzielone elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym białka transferowano na membranę Immobilon®-P (Millipore, USA) o średnicy porów 0,45 µm zgodnie z metodą Towbina i wsp. (1979) w układzie półsuchym w obecności buforu zawierającego 192 mM glicynę, 25 mM Tris (pH 8,3) oraz 20% alkohol metylowy. Transfer prowadzono 1 godzinę przy natężeniu prądu 450 mA w temperaturze pokojowej.

Kontrola efektywności elektrotransferu

Membranę po zakończonym elektrotransferze barwiono roztworem Ponceau S w 3% kwasie octowym przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Nadmiar barwnika usuwano przepłukując membranę wodą do momentu ujawnienia się pasm rozdzielanych białek, co służyło kontroli efektywności elektrotransferu. Membranę do dalszej analizy odbarwiano metanolem.

Immunodetekcja białek na membranie

Immunodetekcję białek na membranie przeprowadzono w obecności swoistych przeciwciał z wykorzystaniem chromogenu Novex® HRP (TMB) (Invitrogen, USA), będącego substratem peroksydazy chrzanu, w następujących po sobie etapach:

- ❖ blokowanie wolnych miejsc na membranie 5% roztworem odtłuszczonego liofilizatu mleka krowiego w buforze TBST o składzie 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl oraz 0,05% Tween 20;
- ❖ pięciokrotne przepłukiwanie membrany buforem TBST przez 5 minut;
- ❖ całonocna inkubacja z przeciwciałami pierwszorzędowymi w temperaturze 4°C;

- ❖ pięciokrotne odpłukiwanie nadmiaru przeciwciał pierwszorzędowych buforem TBST przez 5 minut w temperaturze pokojowej;
- ❖ inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z peroksydazą chrzanu przez 1 godzinę w temperaturze 37°C;
- ❖ pięciokrotne odpłukiwanie nadmiaru przeciwciał drugorzędowych buforem TBST przez 5 minut w temperaturze pokojowej;
- ❖ detekcja antygenów z zastosowaniem substratu chromogennego Novex® HRP (4 ml);
- ❖ przerywanie reakcji enzymatycznej w wyniku przepłukania wodą.

Do immunodetekcji zastosowano poniższe przeciwciała pierwszo- oraz drugorzędowe:

- ❖ anty-betaglikan – pierwszorzędowe poliklonalne przeciwciała królicze klasy IgG skierowane przeciwko regionowi zlokalizowanemu między resztami aminokwasowymi 88-274 betaglikanu ludzkiego pochodzenia (ab97459; abcam®, Wielka Brytania); miano 1:1 000;
- ❖ anty-aktyna – pierwszorzędowe poliklonalne przeciwciała kozle klasy IgG skierowane przeciwko regionowi C-końcowemu aktyny ludzkiego pochodzenia (sc-1616; Santa Cruz Biotechnology, USA); miano 1:1 000;
- ❖ anty-IgG królika – drugorzędowe poliklonalne przeciwciała kozle klasy IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanu skierowane przeciwko immunoglobulinom króliczym klasy IgG (A9169; Sigma-Aldrich, Niemcy); miano 1:20 000;
- ❖ anty-IgG kozła – drugorzędowe poliklonalne przeciwciała królicze klasy IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanu skierowane przeciwko immunoglobulinom kozlim klasy IgG (A8919; Sigma-Aldrich, Niemcy); miano 1:5 000.

Usuwanie kompleksów przeciwciał z membrany celem ponownej immunodetekcji związanych antygenów

Z membrany Immobilon®-P (Millipore, USA) po immunodetekcji betaglikanu usuwano kompleksy przeciwciał celem immunodetekcji aktywny. Procedura ta obejmowała następujące etapy:

- ❖ inkubacja membrany w buforze zawierającym 2% SDS, 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) oraz 0,8% 2-merkapttoetanol w temperaturze 50°C przez 45 minut;
- ❖ przepłukiwanie membrany pod bieżącą wodą, przez co najmniej 1 godzinę;
- ❖ odpłukanie ewentualnych pozostałości 2-merkapttoetanolu buforem TBST przez 5 minut.

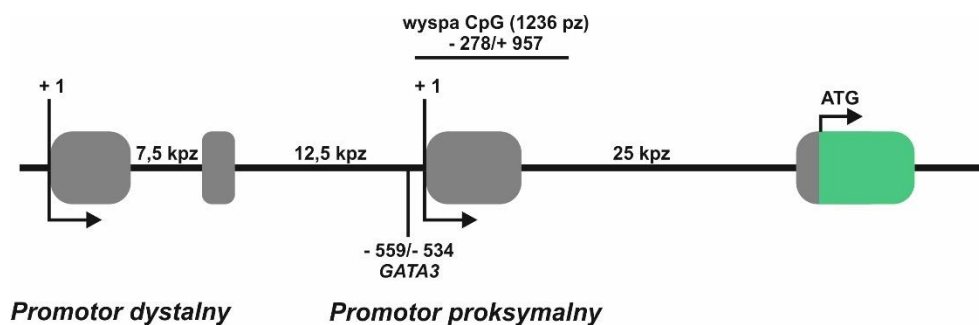
Analiza densytometryczna

Membrany po wizualizacji antygenów w wyniku barwnej reakcji peroksydazy chrzanu z substratem chromogennym skanowano, a następnie poddawano analizie densytometrycznej przy użyciu programu Gel-Pro Analyser ver. 3.0 dla systemu operacyjnego Windows (Media Cybernetics, USA).

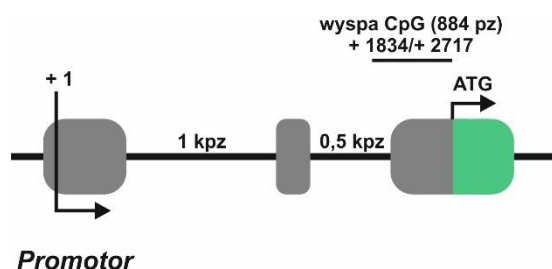
4.9. Analiza metylacji DNA techniką metylospecyficznej reakcji łańcuchowej polimerazy (MSP-PCR)

Wybór miejsc metylacji wysp CpG

Bioinformatyczną analizę występowania potencjalnych miejsc metylacji w regionie promotorowym genu *TGFBR3* oraz projektowanie starterów użytych w reakcji MSP-PCR (ang. *methylation-specific PCR*) przeprowadzono za pomocą programu MethPrimer (Li i Dahiya, 2002). Analizowano sekwencję DNA odpowiadającą promotorowi proksymalnemu genu *TGFBR3*, którego aktywność obserwuje się w większości typów tkanek (**Ryc. 4.4.**). Wytypowano wyspę CpG o długości 1236 pz zlokalizowaną względem miejsca startu transkrypcji genu *TGFBR3* w pozycji -278/+957. Miejsce metylacji i sekwencje starterów użytych w toku analizy metylacji regionu promotorowego genu *GATA3* zaczerpnięto z publikacji Coopera i wsp. (2010). Analizowano wyspę CpG o długości 884 pz zlokalizowaną w pozycji +1834/+2717 (**Ryc. 4.5.**).



Rycina 4.4. Lokalizacja analizowanej wyspy CpG w regionie promotorowym genu *TGFB3*.



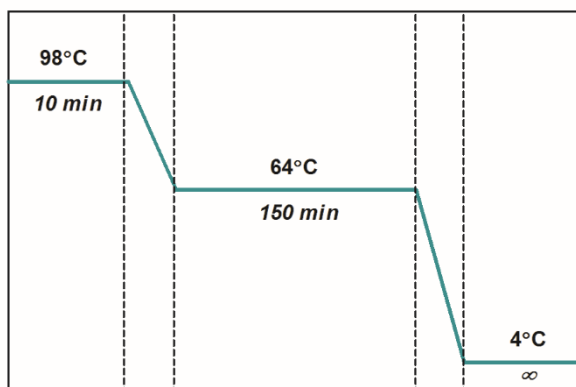
Rycina 4.5. Lokalizacja analizowanej wyspy CpG w regionie promotorowym genu *GATA3*.

Konwersja DNA wodorosiarczynem sodu

W celu oceny metylacji wysp CpG zastosowano metodę metylospecyficznej reakcji łańcuchowej polimerazy MSP-PCR. Pierwszym etapem metody MSP-PCR jest konwersja DNA wodorosiarczynem sodu, w wyniku której reszty cytozyny ulegają deaminacji do uracylu, podczas gdy reszty 5-metylocytozyny pozostają niezmienione. Stosując odpowiednio zaprojektowane pary starterów specyficznych dla sekwencji metylowanych oraz niemetylowanych, uzyskujemy w toku reakcji PCR dwie pule produktów, których pomiar gęstości optycznej w żelu agarozowym służy do badań porównawczych profilu metylacyjnego w preparatach nowotworowych względem tkanki prawidłowej (Herman i wsp., 1996).

Reakcję konwersji DNA wodorosiarczynem sodu przeprowadzano przy użyciu komercyjnego zestawu EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, USA). Konwersji poddawano 2 µg DNA (0,1 µg/µl) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta zestawu. Konwertowany DNA mieszano ze 130 µl przygotowanego *in situ* buforu CT Conversion Reagent, a następnie inkubowano

w termobloku ThermoStat Plus (Eppendorf, Niemcy) według profilu termicznego przedstawionego na **rycinie 4.6.**

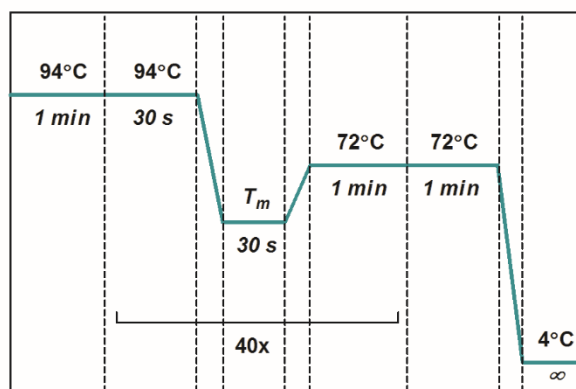


Rycina 4.6. Profil termiczny reakcji konwersji DNA wodorosiarczynem sodu.

Następnie na kolumny Zymo-Spin™ IC column nanoszono 600 µl buforu M-Binding Buffer oraz próbki po inkubacji. Kolumny zwirowywano przy 12 000xg przez 30 sekund, przepłukiwano 100 µl buforu M-Wash Buffer i ponownie wirowano przy 12 000xg przez 30 sekund. Konwertowany DNA związany ze złożem kolumny poddawano reakcji desulfonacji z 200 µl M-Desulphonation Buffer i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Kolumny ponownie wirowano przy 12 000xg przez 30 sekund oraz dwukrotnie przemywano 200 µl buforu M-Wash Buffer. Elucję przekonwertowanego DNA ze złoża przeprowadzano za pomocą 10 µl buforu M-Elution Buffer przy 12 000xg przez 30 sekund. Próbkę przechowywano w temperaturze -20°C do dalszej analizy.

Metylospecyficzna reakcja łańcuchowa polimerazy (MSP-PCR)

Reakcję PCR przeprowadzano na matrycy konwertowanego wodorosiarczynem sodu DNA w mieszaninie reakcyjnej zawierającej: 0,5 µl DNA po konwersji, 1,25 µl buforu reakcyjnego (10x), 0,6 µl mieszaniny dNTP (10 mM), po 0,5 µl każdego ze starterów (5 µM), 0,25 µl polimerazy JumpStart™ Taq DNA (2,5 u/µl; Sigma-Aldrich, Niemcy), uzupełnionej wodą do końcowej objętości 12,5 µl. Amplifikację przeprowadzano w aparacie ThermalCycler 2720 (Applied Biosystems, USA) stosując profil termiczny zalecany przez producenta polimerazy i przedstawiony na **rycynie 4.7.** Reakcję MSP-PCR przeprowadzano równolegle w obecności kontroli pozytywnej, w której matrycę stanowił ludzki metylowany DNA konwertowany wodorosiarczynem sodu (Bisulfite-Converted Universal Methylated Human DNA Standard; Zymo Research, USA). Charakterystykę oraz sekwencje nukleotydowe zastosowanych starterów przedstawiono w **tabeli 4.1.**



Rycina 4.7. Profil termiczny reakcji MSP-PCR.

Tabela 4.1. Charakterystyka starterów użytych w reakcji MSP-PCR (M – starter specyficzny dla sekwencji metylowanej, U – starter specyficzny dla sekwencji niemetylowanej).

GEN	STARTER	T_m	SEKWENCJA NUKLEOTYDOWA	WIELKOŚĆ PRODUKTU PCR [pz]
TGFB3				
M	sens anti-sens	62°C	5'-TACAAAAATTAACCGAATATAATAACGTA-3' 5'-TTTTGGTTATGTGGTTTTTCGC-3'	218
U	sens anti-sens	54°C	5'-AATACAAAAATTAACCAAATATAATAACAT-3' 5'-TTTGGTTATGTGGTTTTGTGA-3'	219
GATA3				
M	sens anti-sens	62°C	5'-ACGATTTTCGATTTTTCGACGGTAGGAGTTTTTC-3' 5'-GACTATACTCGCGCCCTCTCGCCGA-3'	106
U	sens anti-sens	58°C	5'-ATGATTTTGGATTTTGGATGGTAGGAGTTT-3' 5'-TCAACTATACTCACACCCTCTCA-3'	108

Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji MSP-PCR w żelu agarozowym

Produkty reakcji MSP-PCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym w układzie buforującym TAE zawierającym 40 mM Tris/octan oraz 1 mM EDTA. Wielkość rozdzielanych elektroforetycznie produktów reakcji MSP-PCR określano na podstawie wzorca 50 bp DNA Step Ladder (Sigma-Aldrich, Niemcy). Rozdziału dokonywano przez ok. 45 minut przy napięciu prądu 100 V. Elektroferogramy wizualizowano za pomocą bromku etydydy dodawanego bezpośrednio do żelu agarozowego o stężeniu końcowym 0,5 µg/ml

Analiza densytometryczna elektroferogramów

Elektroferogramy po wizualizacji w świetle UV fotografowano, a następnie poddawano analizie densytometrycznej przy użyciu programu Gel-Pro Analizer ver. 3.0 dla systemu operacyjnego Windows (Media Cybernetics, USA). Na podstawie uzyskanych pomiarów zintegrowanej gęstości optycznej wyliczano indeks metylacji (MI, *ang. methylation index*) za pomocą poniższego wzoru:

$$MI = \frac{IOD_M}{IOD_M + IOD_U} \times 100\%$$

gdzie: MI oznacza indeks metylacji [%], IOD_M oraz IOD_U wartości zintegrowanej gęstości optycznej produktów reakcji MSP-PCR uzyskanych przy użyciu odpowiednio starterów specyficznych względem sekwencji metylowanej (M) oraz niemetylowanej (U).

4.10. Analiza utraty heterozygotyczności na podstawie długości produktów reakcji PCR w automatycznym sekwenatorze DNA

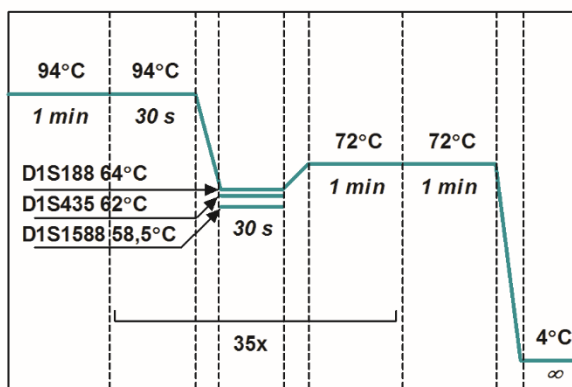
Reakcja łańcuchowa polimerazy

Analizę utraty heterozygotyczności (LOH, *ang. loss of heterozygosity*) w *locus* genu *TGFBR3* dokonywano za pomocą oceny długości produktów reakcji PCR trzech markerów mikrosatelitarnych, tj. D1S188, D1S435 oraz D1S1588 wytypowanych na podstawie danych literaturowych (Dong i wsp., 2007; Finger i wsp., 2008b; Hempel i wsp., 2007; Turley i wsp., 2007). Do reakcji PCR użyto par starterów specyficznych względem każdego z markerów mikrosatelitarnych, z których jeden z każdej pary znakowany był na końcu 5' barwnikiem fluorescencyjnym 6-FAM (*ang. 6-carboxyfluorescein*) lub TET (*ang. 5-tetrachloro-fluorescein*) (Sigma-Aldrich, Niemcy). Sekwencje zastosowanych starterów pochodziły z bazy danych NCBI (*ang. National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe>). **Tabela 4.2.** prezentuje lokalizację oraz charakterystykę użytych w toku analizy starterów.

Tabela 4.2. Charakterystyka markerów mikrosatelitarnych w *locus* genu *TGFBR3* oraz starterów użytych do ich amplifikacji.

POŁOŻENIE	MOTYW/ WIELKOŚĆ PRODUKTU PCR [pz]	T_m	SEKWENCJA NUKLEOTYDOWA	BARWNIK
D1S188				
1p31	(CA) _n / 149-173	64°C	5'-AACCAATCAAGGTGCCTGCA-3' 5'-TCCCCTAGTGTCTGGCAG-3'	- FAM
D1S435				
1p31	(CA) _n / 157-177	62°C	5'-GGTTATTAGGCATGATAAGGG-3' 5'-ACGCTGTCTCTGACAAGAAA-3'	- FAM
D1S1588				
1p33-p32	(AAT) _n / 118-139	58,5 °C	5'-CTGGTCCCATAGCTAGTAAACG-3' 5'-ATGAGGTCCCCATTTACCAT-3'	- TET

Reakcję PCR przeprowadzano na matrycy DNA w mieszaninie reakcyjnej zawierającej: 0,5 μ l DNA (10 ng/ μ l), 2,5 μ l buforu reakcyjnego (10x), 1,6 μ l mieszaniny dNTP (10 mM), po 1 μ l każdego ze starterów (5 μ M), 0,5 μ l polimerazy JumpStart™ *Taq* DNA (2,5 u/ μ l; Sigma-Aldrich, Niemcy), uzupełnionej wodą do końcowej objętości 25 μ l. Amplifikację przeprowadzano w aparacie ThermalCycler 2720 (Applied Biosystems, USA) stosując profil termiczny zalecany przez producenta polimerazy i przedstawiony na **rycinie 4.8.**



Rycina 4.8. Profil termiczny reakcji PCR podczas amplifikacji badanych markerów mikrosatelitarnych w locus genu *TGFBR3*.

Analiza długości produktów reakcji PCR

Analizę długości produktów reakcji PCR w obecności znakowanych fluorescencyjnie starterów przeprowadzano w automatycznym sekwenatorze DNA ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems, USA). Do 3 μ l produktów reakcji PCR dodawano 4 μ l mieszaniny zawierającej dejonizowany formamid, standard wielkości GeneScan™ 350 TAMRA™ (Applied Biosystems, USA) oraz bufor obciążający (50 mg/ml dextran blue, 20 mM EDTA) w stosunku 10:2:1. Próbki denaturowano przez 5 minut w temperaturze 95°C, po czym schładzano na lodzie. Rozdział produktów reakcji PCR przeprowadzany był w 5% żelu poliakrylamidowym Long Ranger™ (BMA, USA) zawierającym 6 M mocznik, 89 mM Tris, 89 mM kwas borny, 2,5 mM EDTA (pH 8,0) przez 2 godziny przy napięciu 1000 V w układzie buforującym 89 mM Tris, 89 mM kwas borny oraz 2,5 mM EDTA (pH 8,0). Elektroferogramy analizowano przy użyciu programu GeneScan® v3.1.2 (Applied Biosystems, USA), który określał długość produktów PCR na podstawie standardu wielkości oraz wyznaczał wysokość oraz pole

powierzchni pików odpowiadających wyznakowanym fluorescencyjnie produktom PCR.

Rozkład fluorescencji pochodzącej od produktów amplifikacji markerów mikrosatelitarnych, zależnie od zygotyiczności analizowanego *locus*, wykazywał obecność jednego bądź dwóch pików, reprezentujących allele danego *locus* odpowiednio dla homozygoty (przypadki nieinformatywne) lub heterozygoty (przypadki informatywne). Utratę heterozygotyczności definiowano jako kompletny zanik lub $\geq 50\%$ redukcję intensywności pików jednego z alleli obserwowane w preparacie nowotworowym w porównaniu do tkanki prawidłowej pochodzącej od tej samej pacjentki. LOH wyrażano za pomocą współczynnika *AR* (*ang. allelic ratio*) wyliczanego zgodnie ze wzorem:

$$AR = \frac{T_1 \times N_2}{T_2 \times N_1}$$

gdzie T_1 oraz N_1 oznaczają pole powierzchni pod pikami pochodzącymi od krótszych produktów amplifikacji danego markera mikrosatelitarnego odpowiednio w materiale nowotworowym (T) oraz prawidłowym (N), podczas gdy T_2 oraz N_2 pola powierzchni analogicznych dłuższych produktów reakcji PCR. Jednocześnie, gdy współczynnik *AR* miał wartość wyższą od 1 stosowano odwrócony wzór:

$$AR = \frac{T_2 \times N_1}{T_1 \times N_2}$$

Wartość współczynnika $AR \leq 0,5$ wskazywała na utratę heterozygotyczności, podczas gdy wartość $AR > 0,5$ stanowiła wynik negatywny.

4.11. Analiza polimorfizmów jednonukleotydowych z zastosowaniem sond fluorescencyjnych TaqMan®

Wybór badanych polimorfizmów

Kryterium wyboru analizowanych polimorfizmów jednonukleotydowych (SNP, *ang. single nucleotide polymorphism*) obejmowało występowanie rzadszego wariantu allelicznego (MAF, *ang. minor allele frequency*) z częstością $\geq 5\%$ w populacji kaukaskiej. Analizą objęto 8 miejsc polimorficznych zlokalizowanych w *locus* genu *TGFBR3*, tj. *rs883873*, *rs2770186*, *rs12141128*, *rs12566180*, *rs6680463*,

rs1805110, rs1805113, rs2296621, których pełna charakterystyka znajduje się w internetowej bazie danych dbSNP (ang. *single nucleotide polymorphism database*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Genotypowanie miejsc polimorficznych z zastosowaniem sond fluorescencyjnych TaqMan®

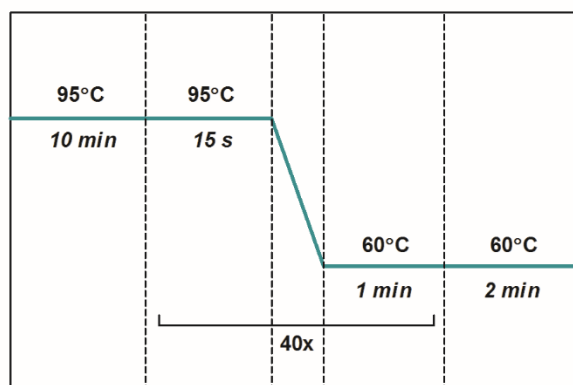
Genotypowanie miejsc polimorficznych dokonywano z zastosowaniem komercyjnych sond TaqMan® (Applied Biosystems, USA) znakowanych zależnie od allelu barwnikami fluorescencyjnymi VIC® oraz 6FAM™. W **tabeli 4.3.** zamieszczono numery oraz sekwencje użytych sond. Reakcję przeprowadzano w obecności dedykowanego buforu reakcyjnego TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, USA).

Tabela 4.3. Charakterystyka sond TaqMan® zastosowanych w reakcji geotypowania miejsc polimorficznych genu *TGFBR3*.

NUMER <i>rs</i>	NUMER SONDY	SEKWENCJA SONDY/BARWNIKI FLUORESCENCYJNE [VIC/FAM]
<i>rs883873</i>	C__8363279_10	CTGCTCTAAGGAAAGTGTCTGATAA[A/G]CAAATTCTAACAAACATATAAAGAA
<i>rs2770186</i>	C__16284894_10	CACTTTCAAGCCCTAAAGAGCCACA[C/T]AGAAGTCAGCCATCCTGAGAACTCT
<i>rs12141128</i>	C__2705390_10	TCTCTATGCTAACTAAGCTCCACAT[A/G]TGGTAAACATCTGCCAAAAAAAAAA
<i>rs12566180</i>	C__2705392_10	TGTCAAATGTAGCCTGCGGGGGTAT[C/T]AGGCAGCATTTGGGTATTTATGTGG
<i>rs6680463</i>	C__26896305_10	ATGAGGGTCTCCCTGAACCCTCTCT[C/G]TTCAGGGTTATACCTTGAACATTGA
<i>rs1805110</i>	C__16171046_10	CAACTTACCTGCAGTGGCTAAACAG[A/G]AGCTCATCAGGGCAAAGATGGCAAT
<i>rs1805113</i>	C__1931721_10	TATCCATGTCAGCTTGCGGGATAGG[A/G]AAGTGCACCTCTTTGGGACTGTAGA
<i>rs2296621</i>	C__9020914_1_	GCAGAACTGACACTTTTCCATTTG[G/T]TAATAAATACTGTGAGAAAGCTCTG

Reakcję genotypowania przeprowadzano w całkowitej objętości 10 µl mieszaniny zawierającej 1 µl DNA (10 ng/µl), 0,25 µl sondy TaqMan® Genotyping Assay (40x), 5 µl buforu TaqMan® Genotyping Master Mix (2x) oraz 3,75 µl wody. Amplifikację wraz z pomiarem fluorescencji w punkcie końcowym dokonywano w aparacie Mastercycler® egradient S realplex⁴ (Eppendorf, Niemcy) zgodnie w profilem termicznym wskazanym przez producenta i przedstawionym

na **rycinie 4.9.** Reakcję genotypowania przeprowadzano równolegle wobec kontroli negatywnej zawierającej użyte odczynniki.



Rycina 4.9. Profil termiczny reakcji genotypowania z zastosowaniem sond TaqMan®.

4.12. Analiza statystyczna

Wyniki badań uzyskane w toku oceny poziomu ekspresji mRNA, białka oraz profili metylacji genów sprawdzano względem zgodności z rozkładem normalnym za pomocą testu Shapiro-Wilka. Porównania grup różnicowych dokonano stosując testy nieparametryczne w zależności od liczby porównywanych grup, tj. test U Manna-Whitney'a oraz test Kruskala-Wallisa. W przypadku wyników sparowanych, tj. uzyskanych dla materiału nowotworowego i prawidłowego pochodzącego od tej samej pacjentki, stosowano nieparametryczny test Wilcoxon. Analizę korelacji poziomu ekspresji badanych genów z poziomem ich metylacji przeprowadzono za pomocą testu korelacji rang Spearmana. Powyższe analizy statystyczne opracowano w programie statystycznym GraphPad Prism v. 5.00 (GraphPad Software, USA).

Ocenę związku częstości występowania utraty heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3* z parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału analizowano stosując dokładny dwustronny test Fishera. Analizę tę przeprowadzono w programie statystycznym STATISTICA v. 10 (StatSoft, Inc., USA).

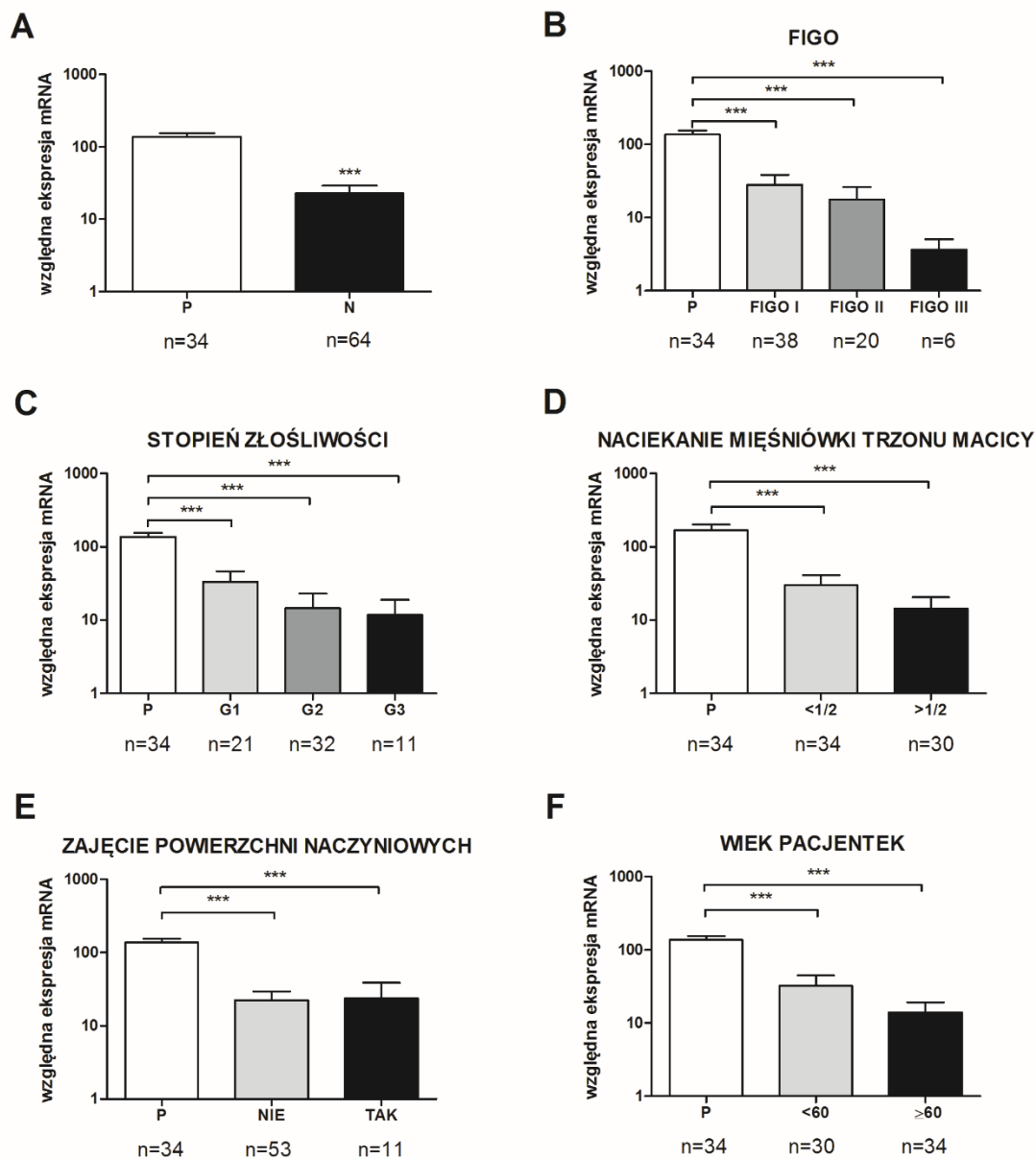
Analiza statystyczna wyników uzyskanych w toku genotypowania badanych miejsc polimorficznych obejmowała sprawdzenie zgodności częstości alleli oraz genotypów z prawem Hardy'ego-Weinberga, tj. porównanie teoretycznego rozkładu genotypów z rozkładem obserwowanym doświadczalnie. Ocenę związku poszczególnych genotypów oraz alleli ze zwiększonym ryzykiem występowaniem raka endometrium, bądź ich asocjację z parametrami kliniczno-patologicznymi analizowanego materiału klinicznego dokonano z zastosowaniem regresji logistycznej. Miarę ryzyka choroby nowotworowej i wystąpienia określonego statusu klinicznego stanowił iloraz szans (OR, *ang. odds ratio*) wraz z 95% przedziałem ufności (95%CI, *ang. confidence interval*). Powyższe analizy przeprowadzono za pomocą programów statystycznych STATISTICA v. 10 (StatSoft, Inc., USA) oraz SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., USA).

5. Wyniki

5.1. Ocena ekspresji genu *TGFBR3* na poziomie mRNA

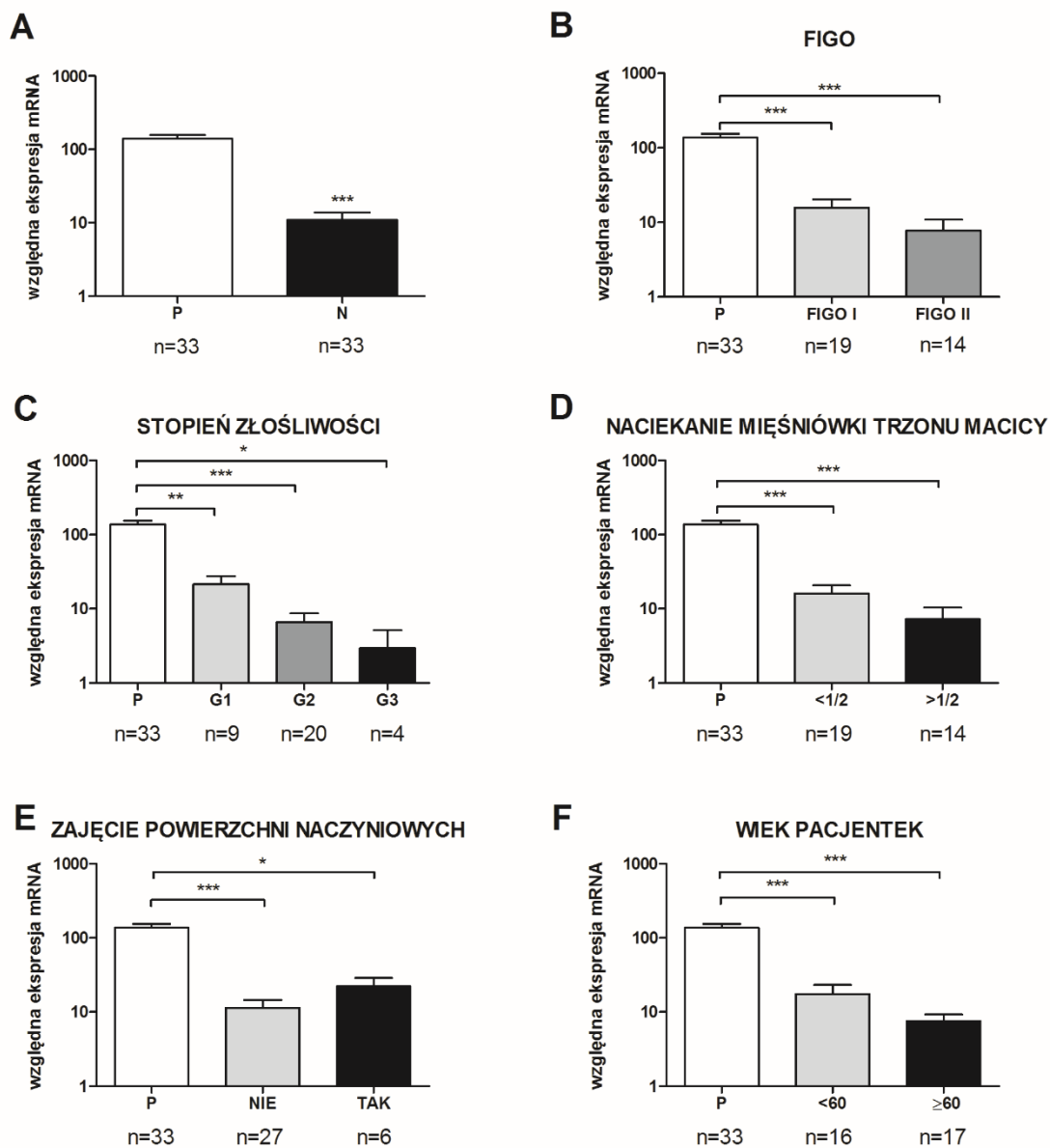
Analizie poddano ogółem 34 preparaty raka endometrium oraz 64 preparaty prawidłowe, z których 66 preparatów stanowiło pary zmian nowotworowych oraz materiału prawidłowego pochodzącego od tej samej pacjentki. Ocenę ekspresji na poziomie mRNA przeprowadzono za pomocą techniki Real-time PCR przy użyciu komercyjnych sond fluorescencyjnych TaqMan® (Applied Biosystems, USA). Ocenie poddano również poziom ekspresji genu *TGFBR3* w zależności od parametrów kliniczno-patologicznych badanego materiału, tj. stadium zaawansowania klinicznego zmian nowotworowych wg skali FIGO, stopnia złośliwości komórek nowotworowych, naciekania mięśniówki trzonu macicy, zajęcia powierzchni naczyń, jak również wieku pacjentek w chwili diagnozy.

Ekspresję genu *TGFBR3* na poziomie mRNA stwierdzono we wszystkich przebadanych przypadkach zarówno nowotworowych, jaki i prawidłowych. Analiza wyników uzyskanych dla przebadanego materiału wykazała istotne statystycznie obniżenie ekspresji mRNA betaglikanu w raku endometrium względem materiału prawidłowego ($p < 0,001$) (**Ryc. 5.1. A.**). Obserwowane obniżenie mRNA betaglikanu ulega nasileniu wraz z progresją procesu nowotworowego ocenianą za pomocą skali FIGO, stopnia zróżnicowania histologicznego komórek nowotworowych oraz naciekania mięśniówki trzonu macicy (**Ryc. 5.1. D.**), a także wieku pacjentek w chwili diagnozy (**Ryc. 5.1. B-D, F.**).



Rycina 5.1. Ekspresja genu *TGFBR3* na poziomie mRNA w raku endometrium; A. Porównanie ekspresji w materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. *** $p < 0,001$.

Obniżenie ekspresji betaglikanu na poziomie mRNA potwierdziła analiza wyników uzyskanych dla przypadków, w których materiał nowotworowy i prawidłowy pochodził od tej samej pacjentki (Ryc. 5.2. A-F.).



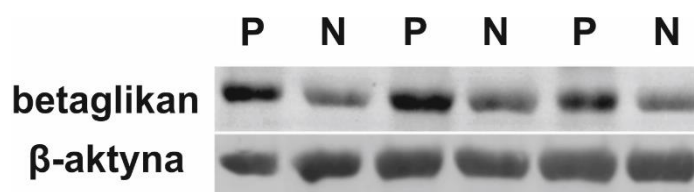
Rycina 5.2. Ekspresja genu *TGFBR3* na poziomie mRNA w raku endometrium; A. Porównanie ekspresji w materiale prawidłowym (P) i nowotworowym pochodzącym od tej samej pacjentki (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

5.2. Ocena ekspresji betaglikanu na poziomie białka

Analizie poddano ogółem 19 preparatów raka endometrium oraz 17 preparatów prawidłowych, z których 28 stanowiło pary zmian nowotworowych oraz materiału prawidłowego pochodzącego od tej samej pacjentki. Ocenę ekspresji na poziomie białka przeprowadzono za pomocą techniki Western blot w obecności komercyjnych przeciwciał skierowanych przeciwko regionowi betaglikanu zlokalizowanemu między resztami aminokwasowymi 88-274. Ocenie poddano również ekspresję betaglikanu na poziomie białka w zależności od parametrów kliniczno-patologicznych badanego materiału.

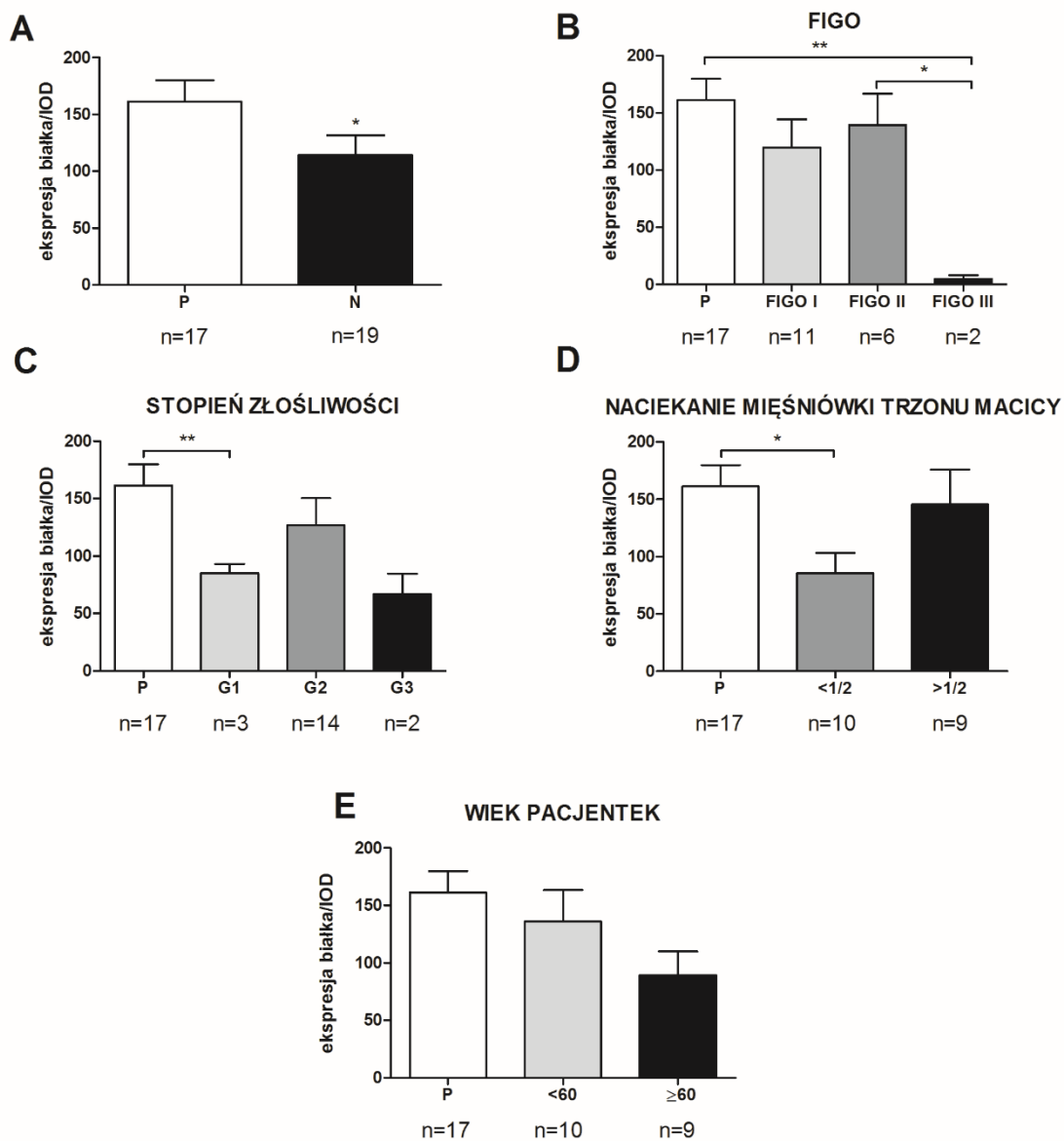
Ekspresję betaglikanu na poziomie białka zaobserwowano we wszystkich przebadanych preparatach zarówno nowotworowych, jaki i prawidłowych.

Rycina 5.3. przedstawia przykładowe wyniki immunodetekcji betaglikanu techniką Western blot w materiale nowotworowym i prawidłowym.

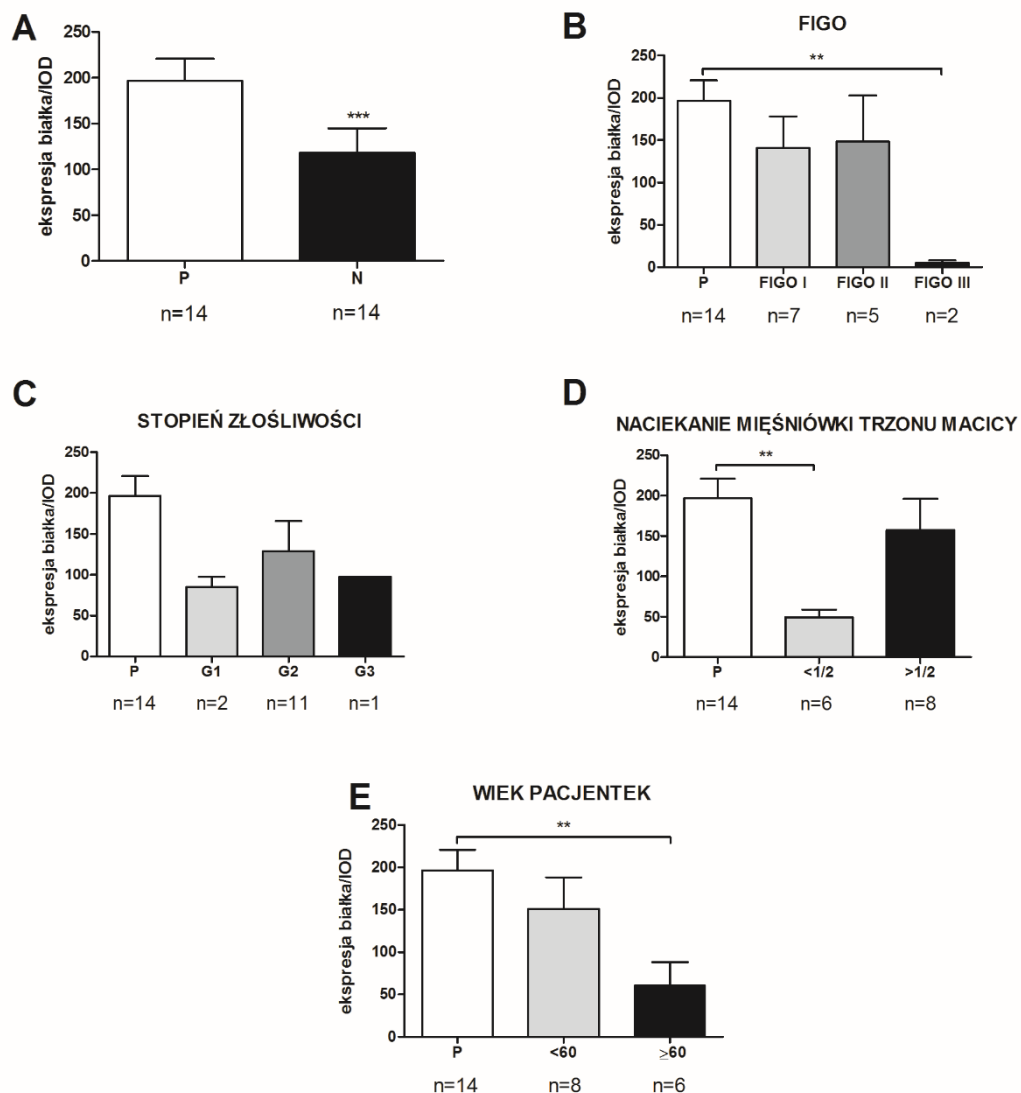


Rycina 5.3. Immunodetekcja betaglikanu – materiał prawidłowy (P), rak endometrium (N). Opis immunodetekcji w rozdziale *Metody*.

Analiza wyników uzyskanych dla całego przebadanego materiału (**Ryc. 5.4. A.**), jak również dla przypadków, w których materiał nowotworowy i prawidłowy pochodził od tej samej pacjentki (**Ryc. 5.4 A.**) wykazała istotne statystycznie obniżenie ekspresji betaglikanu w raku endometrium w porównaniu z materiałem prawidłowym (odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,001$). Obniżenie poziomu betaglikanu wydaje się towarzyszyć progresji procesu nowotworowego, przy czym istotność statystyczną zaobserwowano w przypadku stadium zaawansowania klinicznego FIGO III ($p < 0,01$), stopnia złośliwości G1 ($p < 0,01$) oraz naciekania mięśniówki trzonu macicy, w przypadkach, w których komórki nowotworowe nie przekraczały połowy jej grubości ($p < 0,05$; $p < 0,01$), a także wieku pacjentek powyżej 60 lat w chwili diagnozy ($p < 0,01$) (**Ryc. 5.4. B-E.**, **Ryc. 5.5 B-E.**).



Rycina 5.4. Ekspresja betaglikanu na poziomie białka w raku endometrium; A. Porównanie ekspresji w materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-E. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

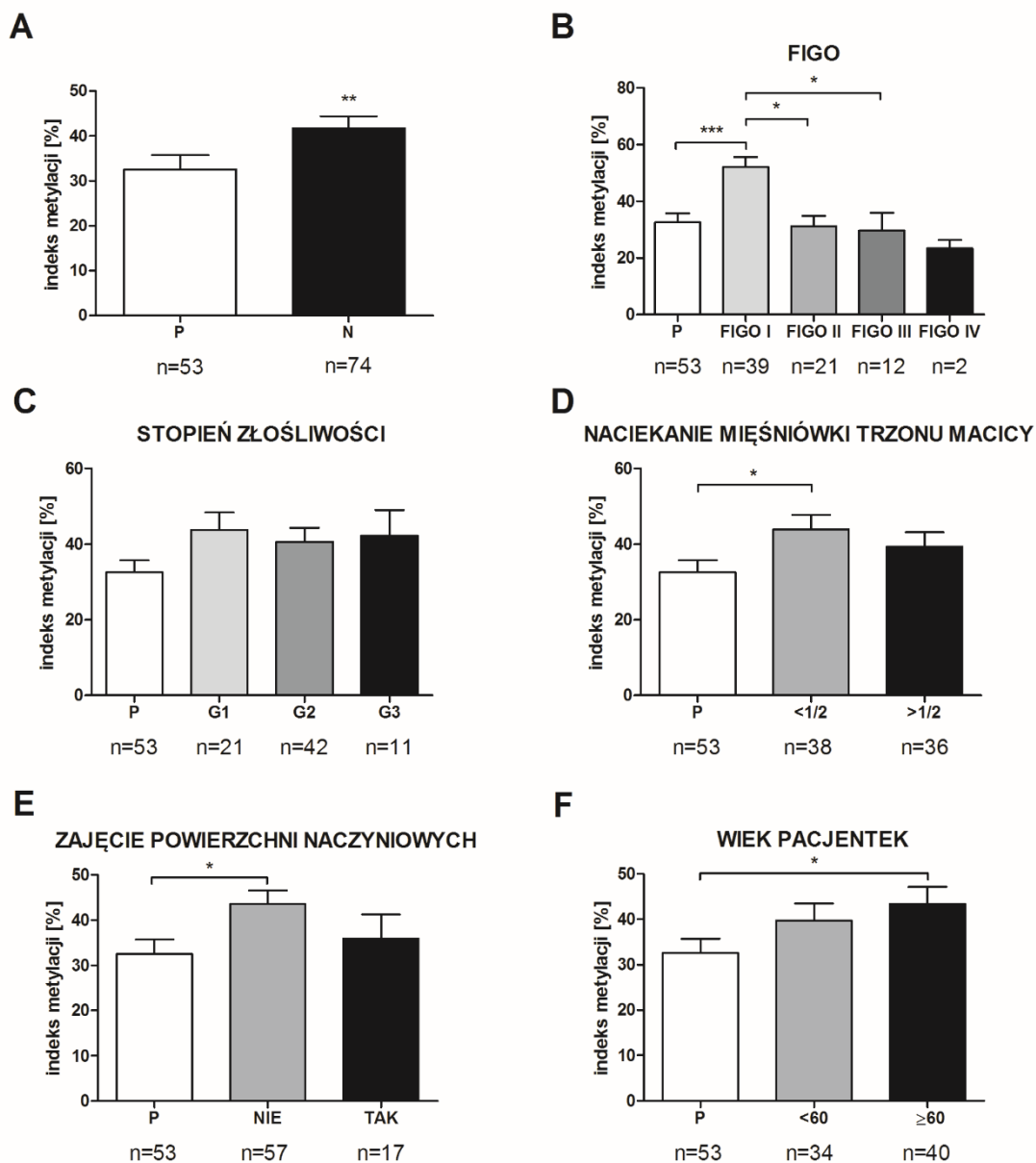


Rycina 5.5. Ekspresja betaglikanu na poziomie białka w raku endometrium; A. Porównanie ekspresji w pochodzącym od tej samej pacjentki materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N) B-E. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$.

5.3. Ocena metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3*

Analizie poddano ogółem 53 preparaty raka endometrium oraz 74 preparaty prawidłowe, z których 92 preparaty stanowiły pary zmian nowotworowych oraz materiału prawidłowego pochodzącego od tej samej pacjentki. Analizę metylacji genu *TGFBR3* przeprowadzono za pomocą techniki MSP-PCR.

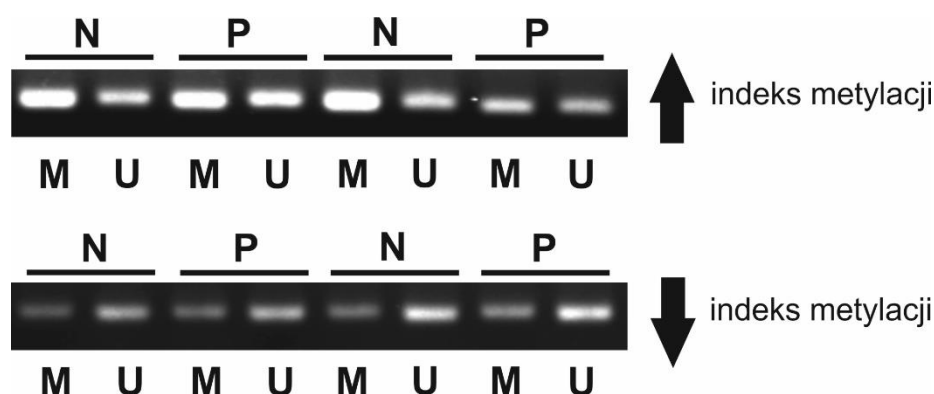
Ocena statystyczna wyników uzyskanych w toku analizy MSP-PCR wykazała istotny wzrost poziomu metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* w preparatach nowotworowych w porównaniu do materiału prawidłowego ($p<0,01$) (**Ryc. 5.6. A.**). Istotny statystycznie wzrost poziomu metylacji genu *TGFBR3* zaobserwowano w przypadku stadium zaawansowania klinicznego FIGO I ($p<0,001$) (**Ryc. 5.6. B.**), naciekania mięśniówki trzonu macicy poniżej połowy jej grubości ($p<0,05$) (**Ryc. 5.6. D.**), braku zajęcia powierzchni naczyńiowych ($p<0,05$) (**Ryc. 5.6. E.**) oraz w grupie pacjentek w wieku powyżej 60 lat ($p<0,05$) (**Ryc. 5.6. F.**).



Rycina 5.6. Ocena metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* w raku endometrium; A. Porównanie indeksu metylacji w materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

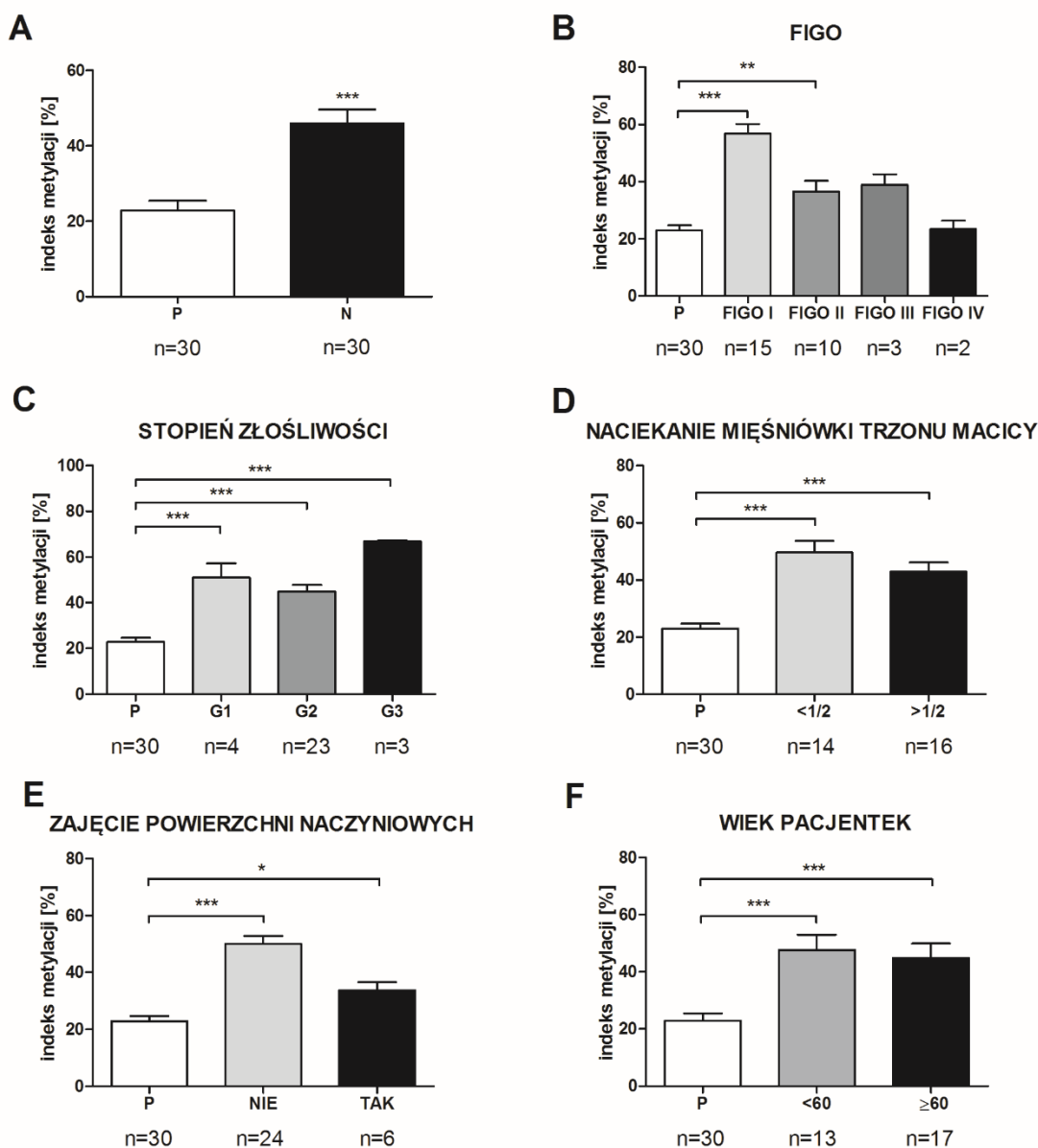
Przeprowadzona następnie szczegółowa analiza wyników uzyskanych dla materiału nowotworowego i prawidłowego pochodzącego od tej samej pacjentki wykazała interesujące z punktu widzenia molekularnego zróżnicowanie osobnicze w poziomie metylacji genu *TGFBR3* (Ryc. 5.7.). Spośród przebadanych 46 par preparatów, 65% (30/46) przypadków nowotworowych cechował istotny statystycznie wzrost ($p < 0,001$) poziomu metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* (Ryc. 5.8. A.), podczas gdy w pozostałych 35% (16/46) przypadków

zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu metylacji ($p<0,001$) (Ryc. 5.9. A.).



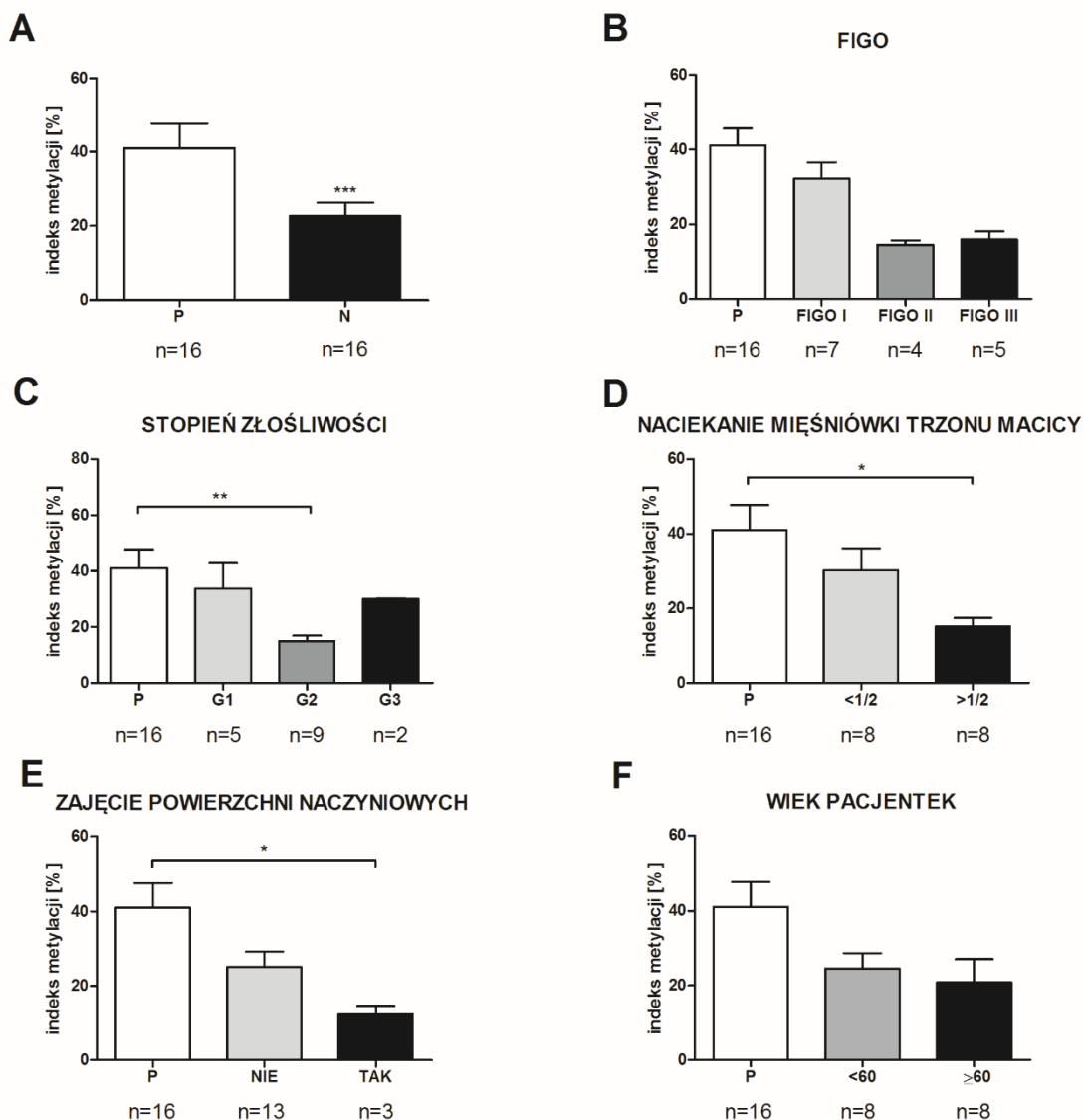
Rycina 5.7. Metylacja regionu promotorowego genu *TGFBR3* – materiał prawidłowy (P), rak endometrium (N), produkt reakcji PCR ze starterami specyficznymi względem sekwencji metylowanej (M), produkt reakcji PCR ze starterami specyficznymi względem sekwencji niemetylowanej (U).

W przypadku preparatów, w których zanotowano podwyższony poziom metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* istotne statystycznie różnice zaobserwowano w stadiach zaawansowania klinicznego FIGO I ($p<0,001$) oraz FIGO II ($p<0,01$) (Ryc. 5.8. A.); we wszystkich trzech stopniach złośliwości komórek nowotworowych, tj. G1 ($p<0,001$), G2 ($p<0,001$) oraz G3 ($p<0,001$) (Ryc. 5.8. C.); w przypadku naciekania mięśniówki trzonu macicy zarówno poniżej ($p<0,001$), jak i powyżej ($p<0,001$) połowy jej grubości (Ryc. 5.8. D.); w przypadku zarówno braku ($p<0,001$), jak i obecności zajęcia ($p<0,05$) powierzchni naczyńiowych (Ryc. 5.8. E.), a także niezależnie od wieku pacjentek w chwili diagnozy ($p<0,001$) (Ryc. 5.8. F.).



Rycina 5.8. Ocena metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* w przypadkach raka endometrium wykazujących podwyższenie poziomu metylacji; A. Porównanie indeksu metylacji w pochodzącym od tej samej pacjentki materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

W grupie preparatów, w których stwierdzono obniżenie poziomu metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* statystycznie istotne różnice dotyczyły stopnia złośliwości komórek nowotworowych G2 ($p<0,01$) (Ryc. 5.9. C.), naciekania mięśniówki trzonu macicy powyżej połowy jej grubości ($p<0,05$) (Ryc. 5.9. D.) oraz zajęcia powierzchni naczyniowych ($p<0,05$) (Ryc. 5.9. E.).

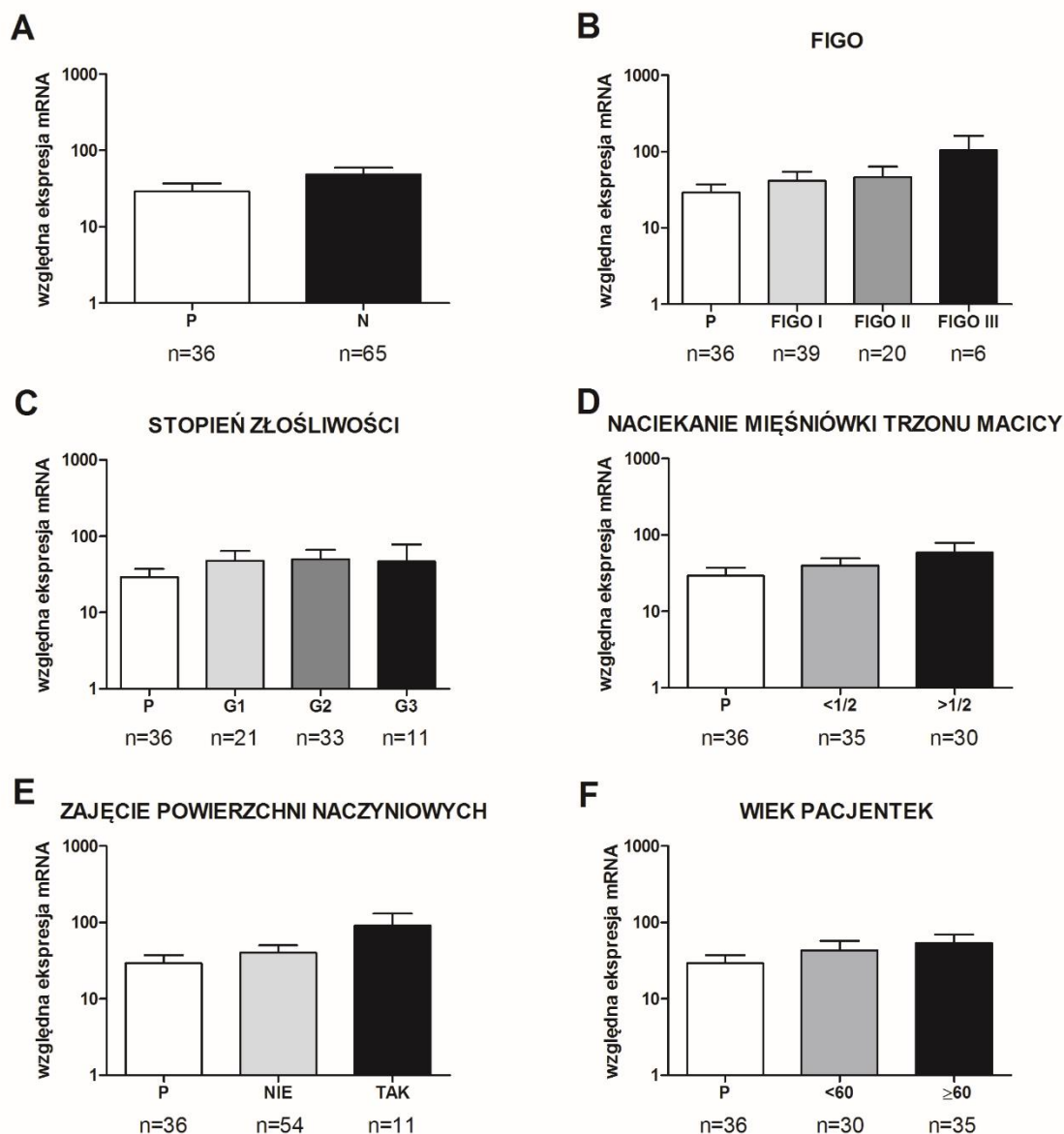


Rycina 5.9. Ocena metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* w przypadkach raka endometrium wykazujących obniżenie poziomu metylacji; A. Porównanie indeksu metylacji w pochodzącym od tej samej pacjentki materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

5.4. Ocena ekspresji na poziomie mRNA czynnika transkrypcyjnego GATA3 regulującego ekspresję betaglikanu

Analizie poddano ogółem 65 preparatów raka endometrium oraz 36 preparatów prawidłowych, z których 72 preparaty stanowiły pary zmian nowotworowych oraz materiału prawidłowego pochodzącego od tej samej pacjentki. Ocenę ekspresji genu *GATA3* na poziomie mRNA przeprowadzono za pomocą techniki Real-time PCR przy użyciu komercyjnych sond fluorescencyjnych TaqMan® (Applied Biosystems, USA). Ocenie poddano również poziom ekspresji genu *GATA3* w zależności od parametrów kliniczno-patologicznych badanego materiału.

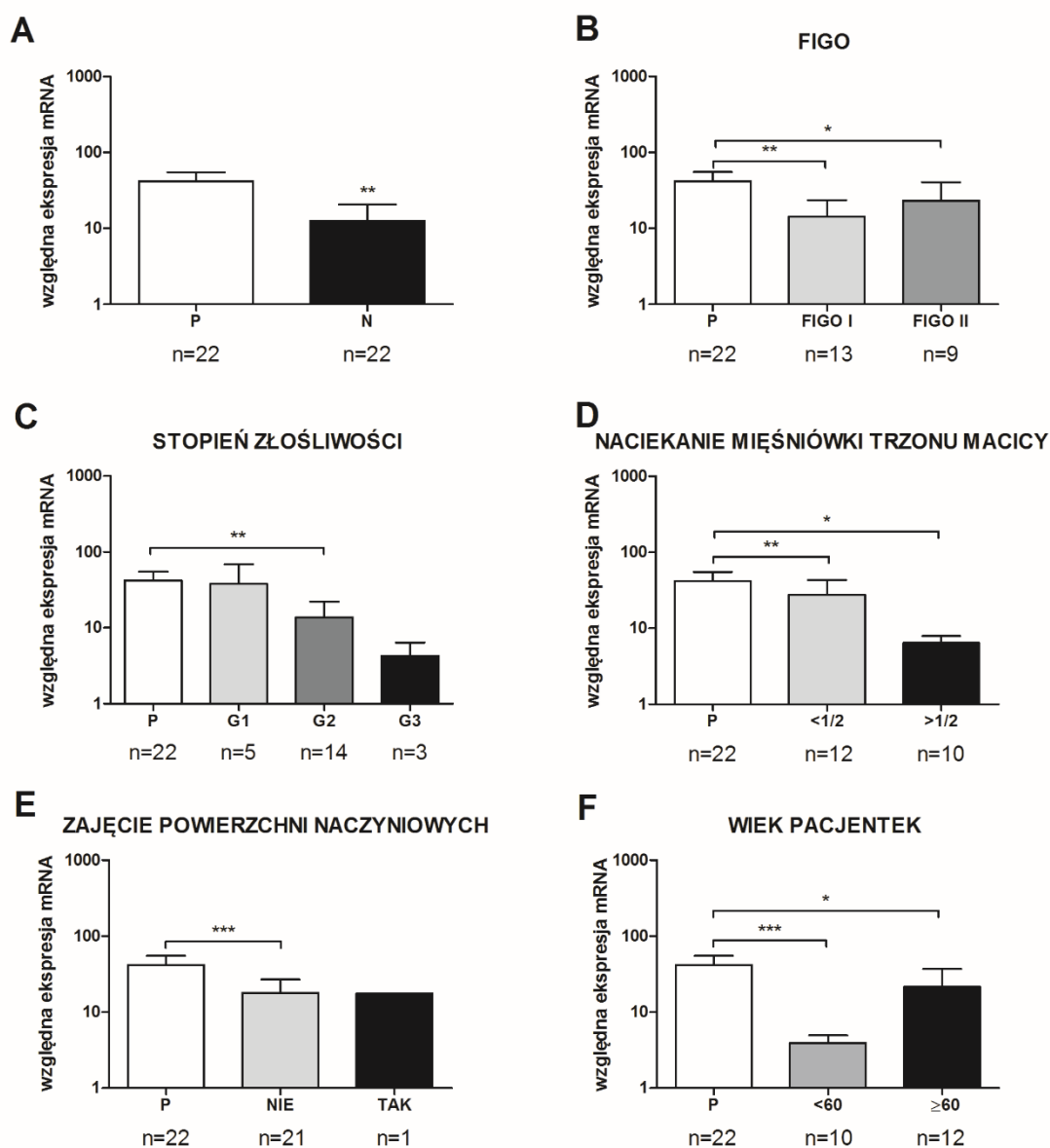
Ekspresję czynnika transkrypcyjnego GATA3 na poziomie mRNA stwierdzono we wszystkich przebadanych preparatach zarówno nowotworowych, jaki i prawidłowych. Analiza wyników uzyskanych dla całego przebadanego materiału wykazała brak statystycznie istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *GATA3* w raku endometrium w porównaniu z materiałem prawidłowym, niezależnie od stopnia zaawansowania procesu nowotworowego czy wieku pacjentek (**Ryc. 5.10. A-F.**).



Rycina 5.10. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego GATA3 na poziomie mRNA w raku endometrium; A. Porównanie ekspresji w materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych.

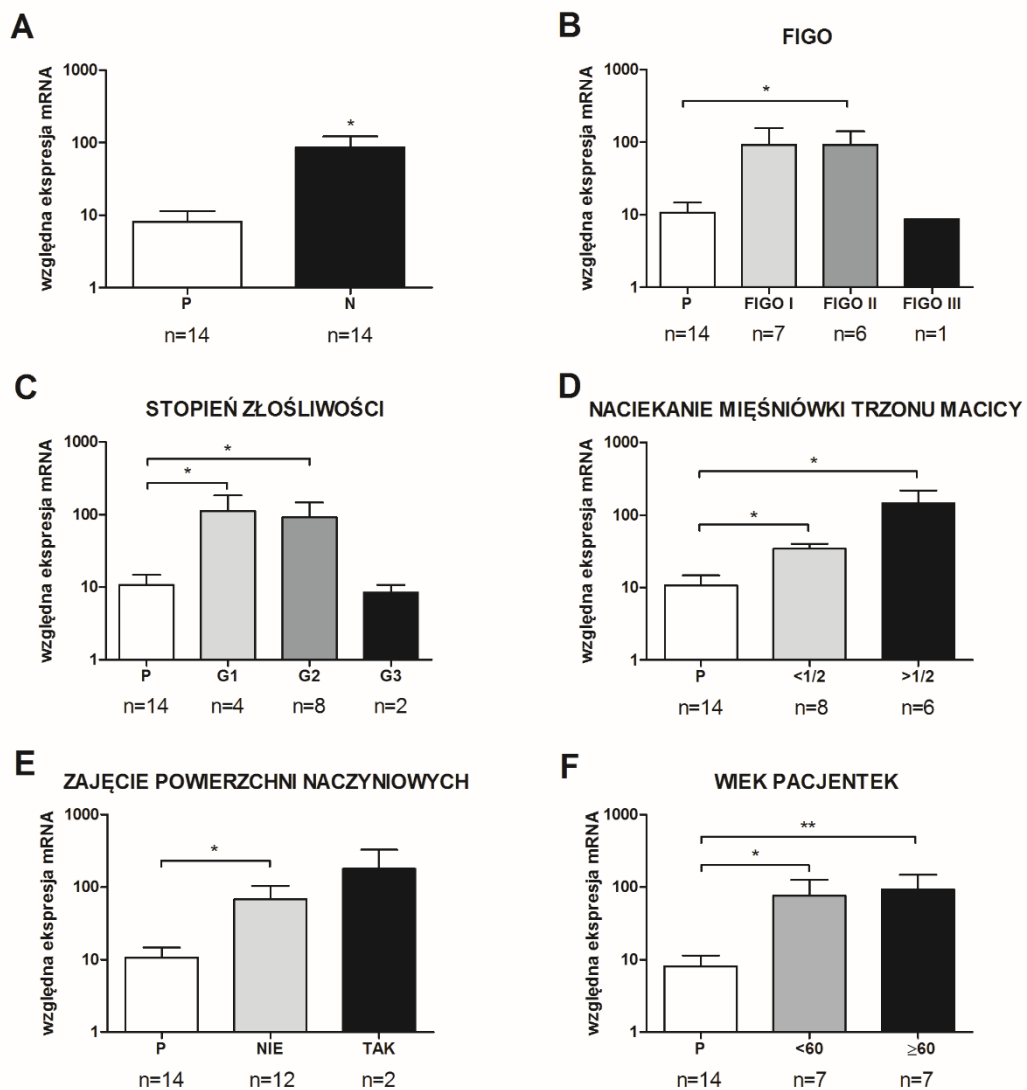
Jednak szczegółowa analiza wyników uzyskanych dla materiału nowotworowego i prawidłowego pochodzącego od tej samej pacjentki wykazała zróżnicowany osobniczo poziom ekspresji genu *GATA3*. W 61% (22/36) par preparatów zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji genu *GATA3* ($p < 0,01$) (Ryc. 5.11 A.). Istotny statystycznie spadek ilości transkryptu genu *GATA3* stwierdzono w przypadku materiału nowotworowego w stadium zaawansowania FIGO I ($p < 0,01$) oraz FIGO II ($p < 0,05$) (Ryc. 5.11. B.), stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych G2 ($p < 0,01$) (Ryc. 5.11. C.),

naciekania mięśniówki trzonu macicy poniżej ($p<0,01$) oraz powyżej połowy jej grubości ($p<0,05$) (Ryc. 5.11. D.), a także braku zajęcia powierzchni naczyńnowych przez komórki nowotworowe ($p<0,001$) (Ryc. 5.11. E.). Istotnie statystycznie obniżenie poziomu mRNA genu *GATA3* wykazano niezależnie od wieku pacjentek w chwili diagnozy choroby nowotworowej (Ryc. 5.11. F.), przy czym dotyczy ono głównie pacjentek w wieku poniżej 60 lat.



Rycina 5.11. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego *GATA3* na poziomie mRNA w przypadkach raka endometrium wykazujących obniżenie poziomu jego ekspresji; A. Porównanie ekspresji w pochodzącym od tej samej pacjentki materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

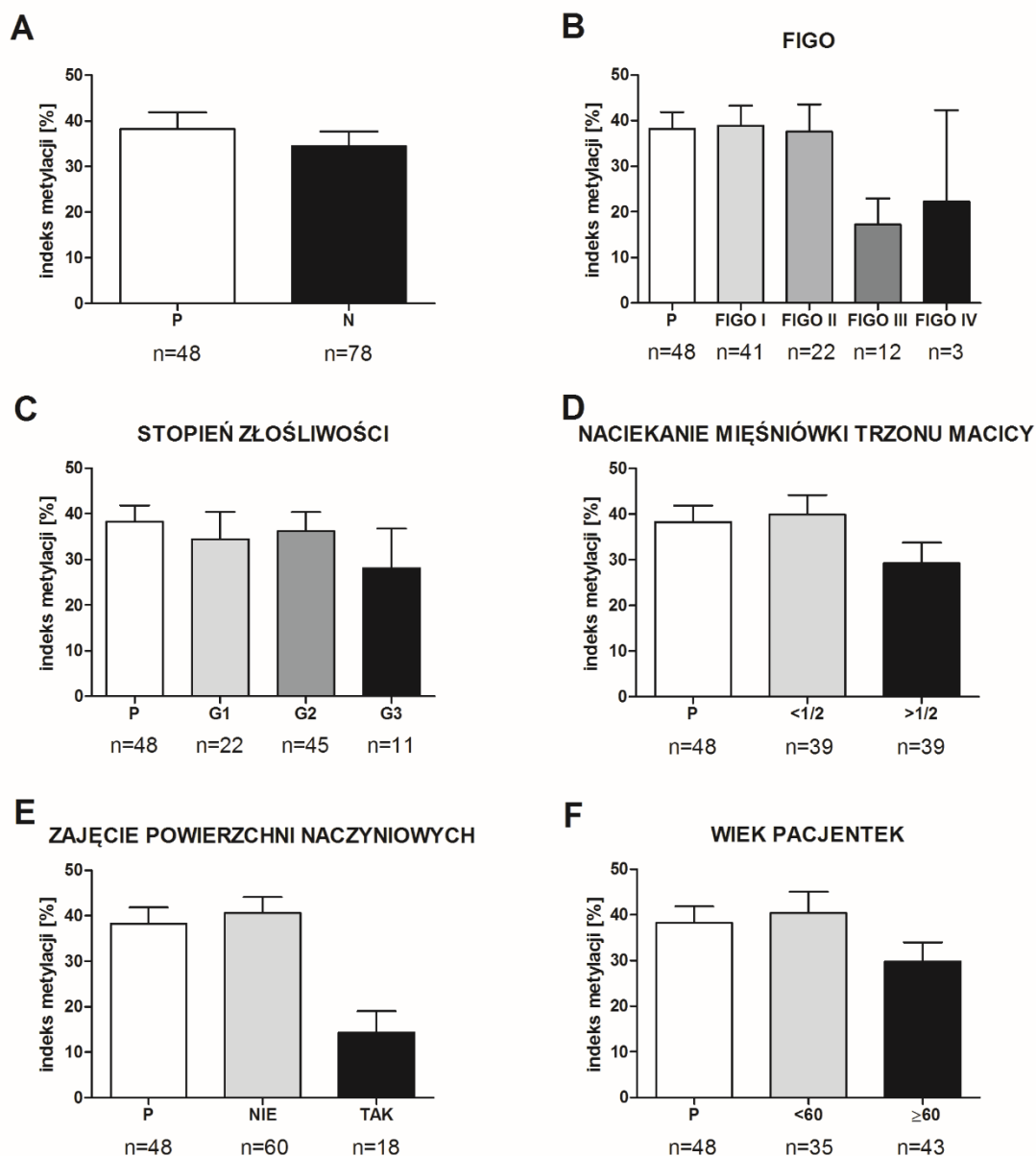
W pozostałych 39% (14/36) par preparatów raka endometrium oraz materiału prawidłowego zaobserwowano istotne statystycznie podwyższenie poziomu ekspresji genu *GATA3* ($p<0,05$) (**Ryc. 5.12. A.**). Wykazany wzrost był statystycznie istotny w przypadku stadium zaawansowania klinicznego nowotworu FIGO II ($p<0,05$) (**Ryc. 5.12. B.**), stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych G1 ($p<0,05$) oraz G2 ($p<0,05$) (**Ryc. 5.12. C.**), a także w naciekania mięśniówki trzonu macicy poniżej ($p<0,05$) oraz powyżej połowy jej grubości ($p<0,05$) (**Ryc. 5.12. D.**). Jednocześnie statystycznie istotną różnicę zaobserwowano także w sytuacji braku zajęcia powierzchni naczyńiowych ($p<0,05$), nie mniej jednak poziom ekspresji genu *GATA3* w tym parametrze wykazywał wyraźną tendencję wzrostową także w grupie preparatów nowotworowych z obecnym naciekaniem światła naczyń krwionośnych (**Ryc. 5.12. E.**). Istotne statystycznie różnice wykazano także niezależnie od wieku pacjentek w chwili diagnozy, tj. w grupie <60 ($p<0,05$) oraz ≥ 60 ($p<0,01$) (**Ryc. 5.12. F.**).



Rycina 5.12. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego GATA3 na poziomie mRNA w przypadkach raka endometrium wykazujących podwyższenie poziomu jego ekspresji; A. Porównanie ekspresji w pochodzącym od tej samej pacjentki materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

5.5. Ocena metylacji regionu promotorowego genu *GATA3*

Analizie poddano ogółem 78 preparatów raka endometrium oraz 48 preparatów prawidłowych, z których 96 preparatów stanowiło pary zmian nowotworowych oraz materiału prawidłowego pochodzącego od tej samej pacjentki. Ocenę metylacji regionu promotorowego genu *GATA3* przeprowadzono za pomocą techniki MSP-PCR. Ocenie poddano również poziom metylacji genu *GATA3* w zależności od parametrów kliniczno-patologicznych badanego materiału.

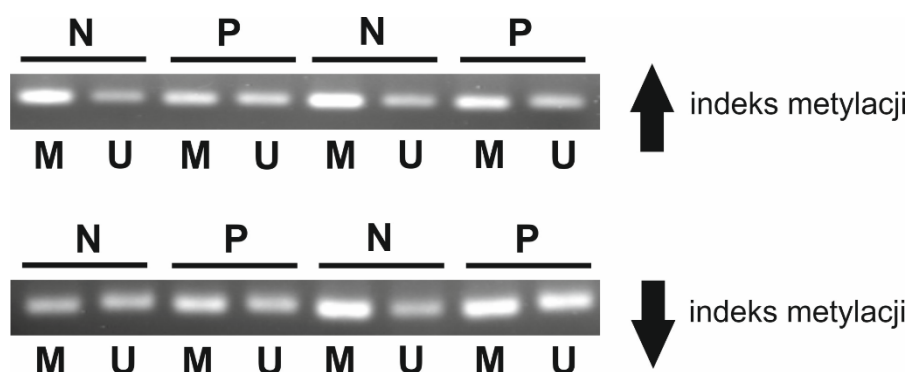


Rycina 5.13. Ocena metylacji regionu promotorowego genu *GATA3* w raku endometrium; A. Porównanie indeksu metylacji w materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych.

Ocena statystyczna wyników uzyskanych w toku analizy MSP-PCR wykazała brak istotnych różnic w poziomie metylacji genu *GATA3* w preparatach nowotworowych w porównaniu do materiału prawidłowego, a także w odniesieniu do parametrów kliniczno-patologicznych nowotworu (**Ryc. 5.13. A-F.**).

Przeprowadzona jednak szczegółowa analiza wyników uzyskanych dla materiału nowotworowego i prawidłowego pochodzącego od tej samej

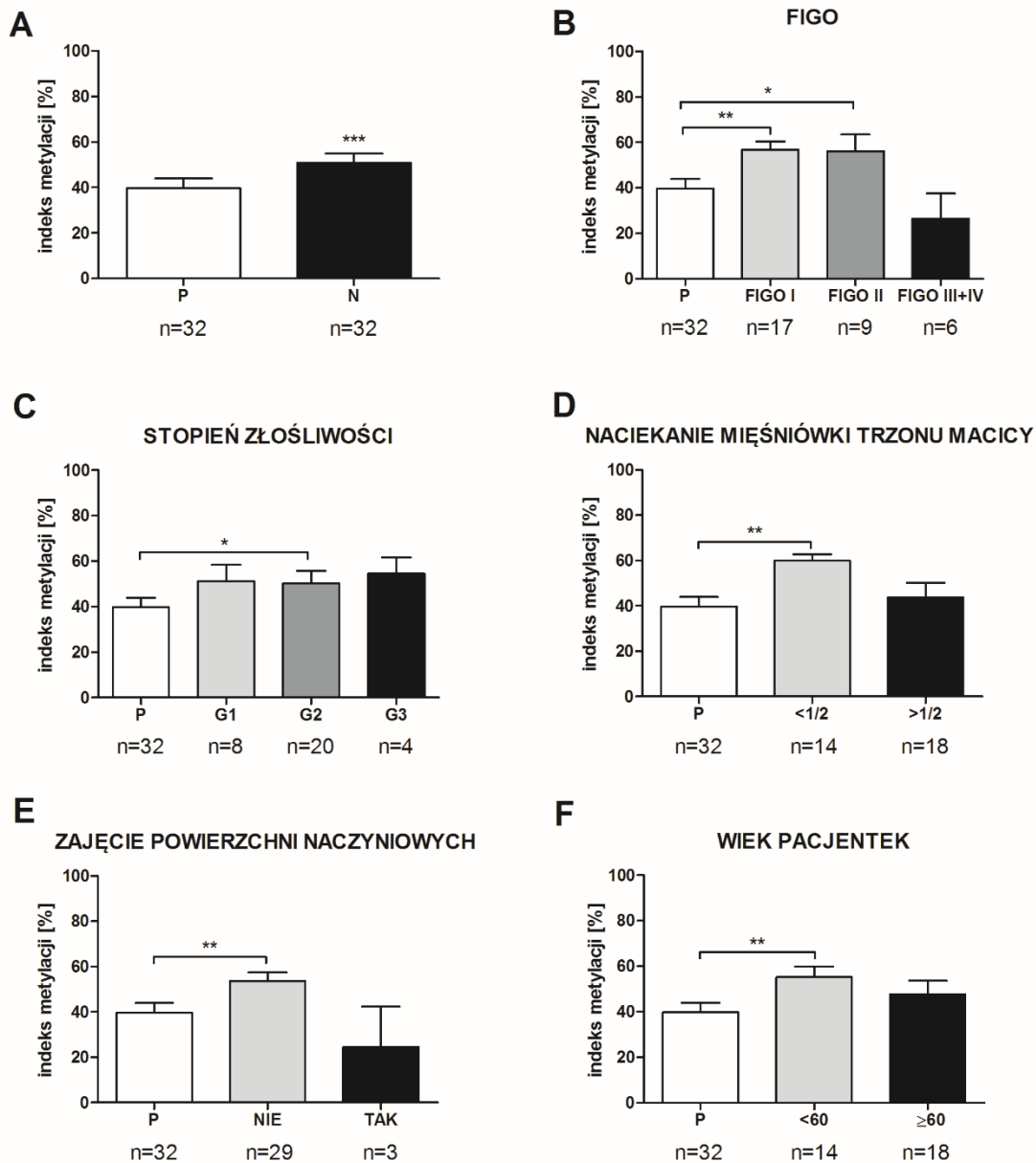
pacjentki wykazała, podobnie jak w przypadku genu *TGFBR3*, zróżnicowanie osobnicze w poziomie metylacji genu *GATA3* (**Ryc. 5.14.**).



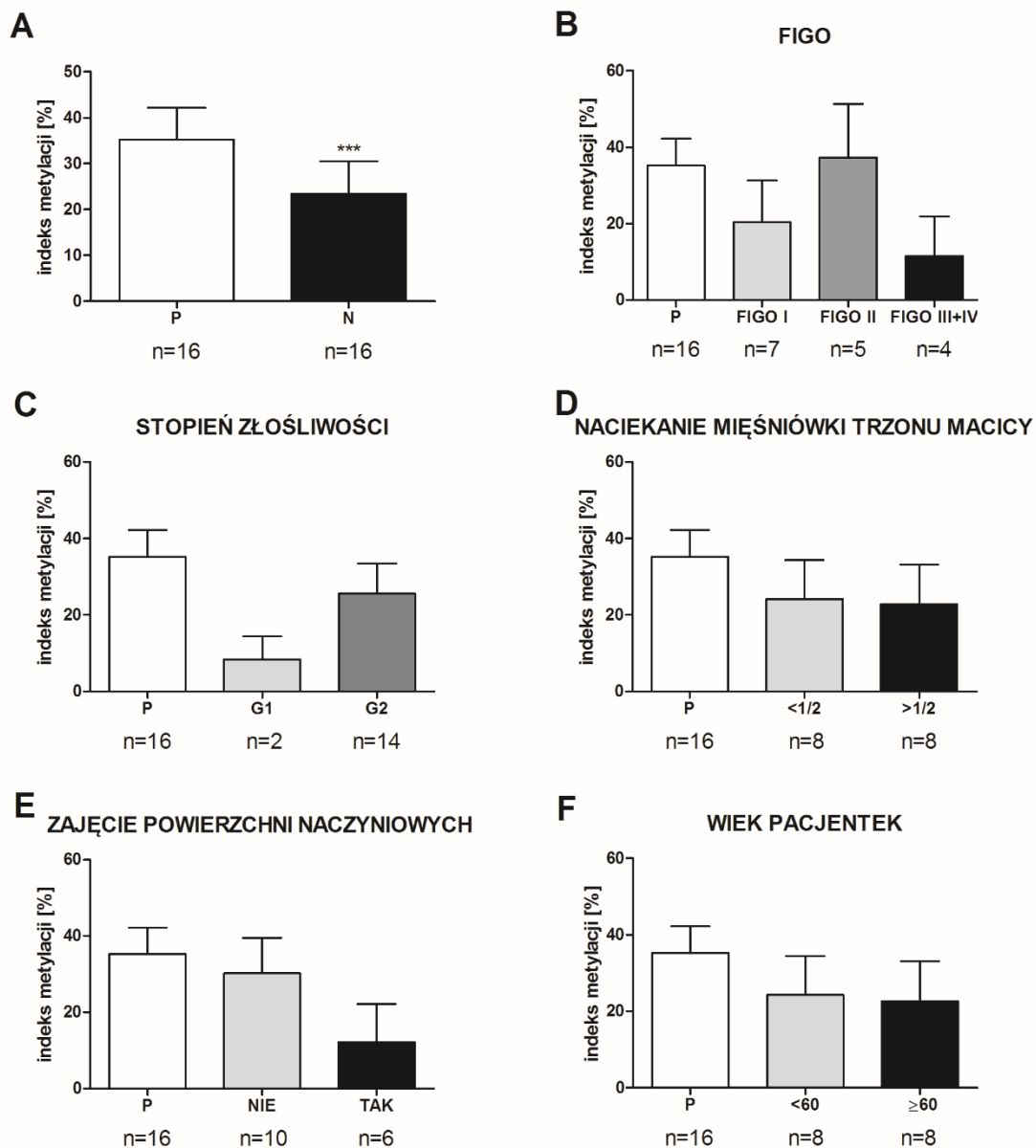
Rycina 5.14. Metylacja regionu promotorowego genu *GATA3* – materiał prawidłowy (P), rak endometrium (N), produkt reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla sekwencji metylowanej (M), produkt reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla sekwencji niemetylowanej (U).

Spośród przebadanych 48 par preparatów, w 67% (32/48) przypadków zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu metylacji ($p < 0,001$) (**Ryc. 5.15. A.**), podczas gdy pozostałe 33% (16/48) przypadków cechował istotny statystycznie spadek poziomu metylacji ($p < 0,001$) (**Ryc. 5.16. A.**).

W preparatach, w których obserwowano wzrost indeksu metylacji genu *GATA3* wykazano istotne statystycznie różnice w przypadku stadiów zaawansowania klinicznego raka FIGO I ($p < 0,01$) oraz FIGO II ($p < 0,05$) (**Ryc. 5.15. B.**), stopnia złośliwości komórek nowotworowych G2 ($p < 0,05$) (**Ryc. 5.15. C.**), naciekaniu mięśniówki trzonu macicy poniżej połowy jej grubości ($p < 0,01$) (**Ryc. 5.15. D.**) oraz braku zajęcia powierzchni naczyńiowych ($p < 0,01$) (**Ryc. 5.15. E.**). Pod względem wieku pacjentek w chwili diagnozy choroby nowotworowej istotny statystycznie wzrost poziomu metylacji genu *GATA3* odnotowano w grupie kobiet do 60 roku życia ($p < 0,01$) (**Ryc. 5.15. F.**). Natomiast w przypadkach, w których stwierdzono obniżenie poziomu metylacji genu *GATA3*, nie wykazano statystycznie istotnych różnic w odniesieniu do analizowanych parametrów kliniczno-patologicznych nowotworu (**Ryc. 5.16. B-F.**).



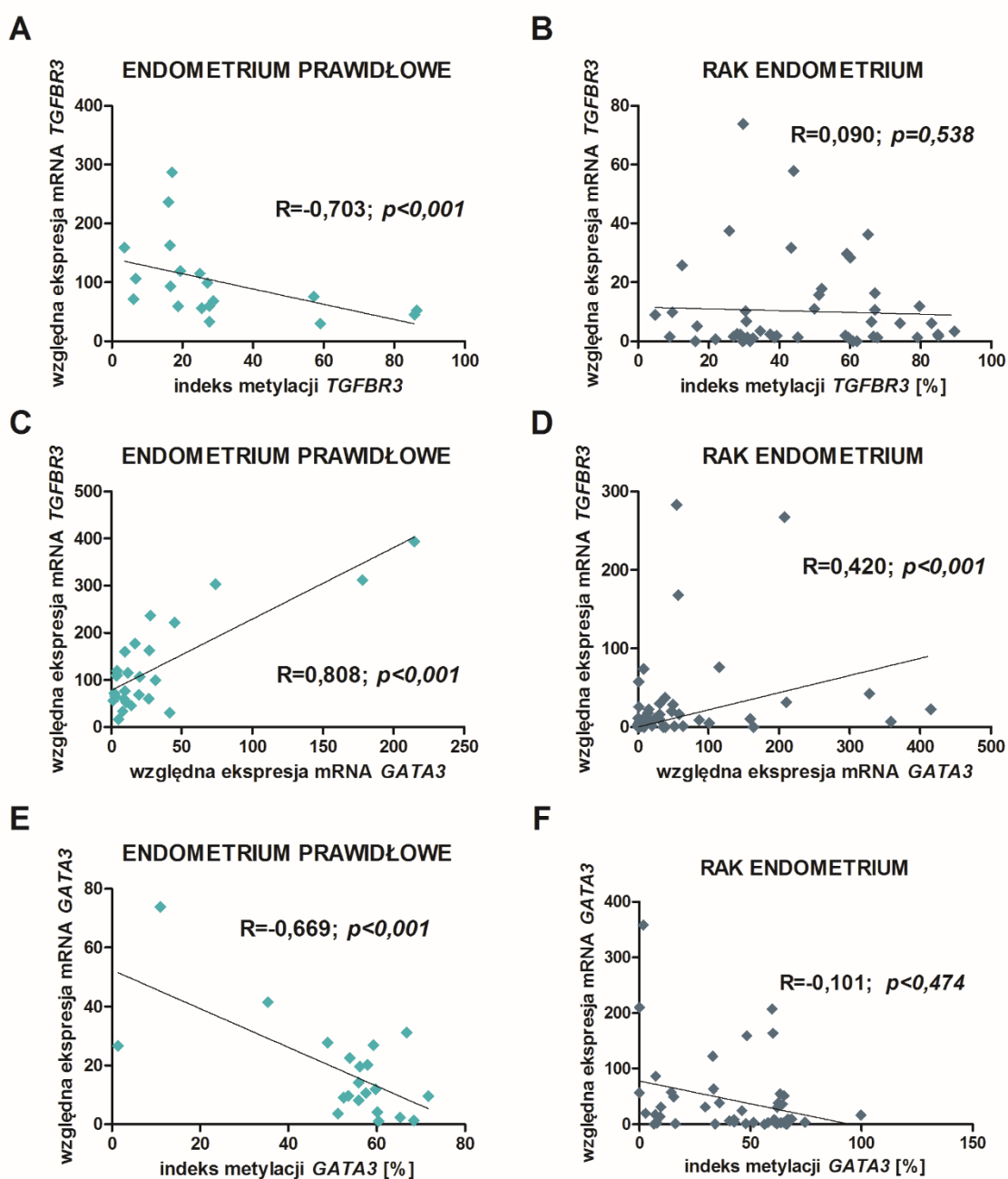
Rycina 5.15. Ocena metylacji regionu promotorowego genu *GATA3* w przypadkach raka endometrium wykazujących podwyższenie poziomu jego metylacji; A. Porównanie indeksu metylacji w pochodzącym od tej samej pacjentki materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.



Rycina 5.16. Ocena metylacji regionu promotorowego genu *GATA3* w przypadkach raka endometrium wykazujących obniżenie poziomu jego metylacji; A. Porównanie indeksu metylacji w pochodzącym od tej samej pacjentki materiale prawidłowym (P) i nowotworowym (N), B-F. skalsyfikowanym wg parametrów kliniczno-patologicznych. *** $p < 0,001$.

5.6. Analiza korelacji ekspresji oraz poziomu metylacji genów *TGFBR3* oraz *GATA3*

Wyniki uzyskane w toku oceny ekspresji i metylacji genu *TGFBR3* oraz genu kodującego regulator ekspresji genu *TGFBR3*, tj. czynnika transkrypcyjnego *GATA3*, stały się podstawą oceny ich korelacji w materiale prawidłowym i nowotworowym (Ryc. 5.17.).



Rycina 5.17. Analiza korelacji ekspresji oraz poziomu metylacji genów *TGFBR3* oraz *GATA3*.

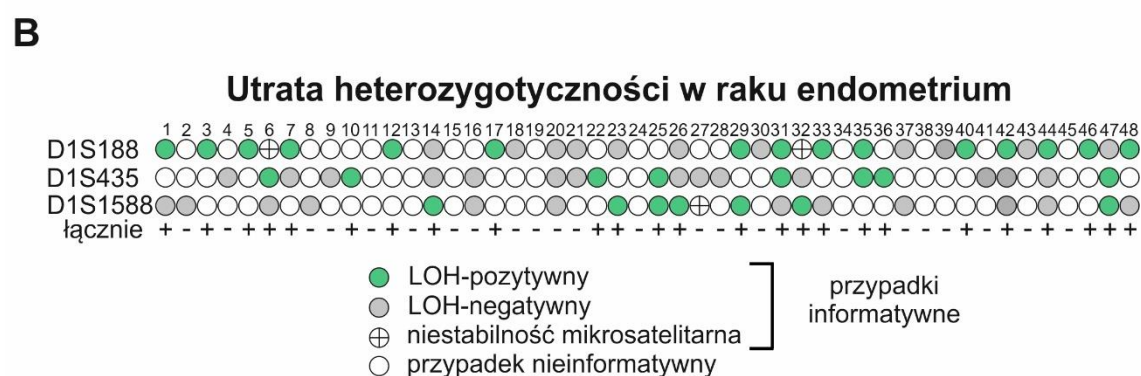
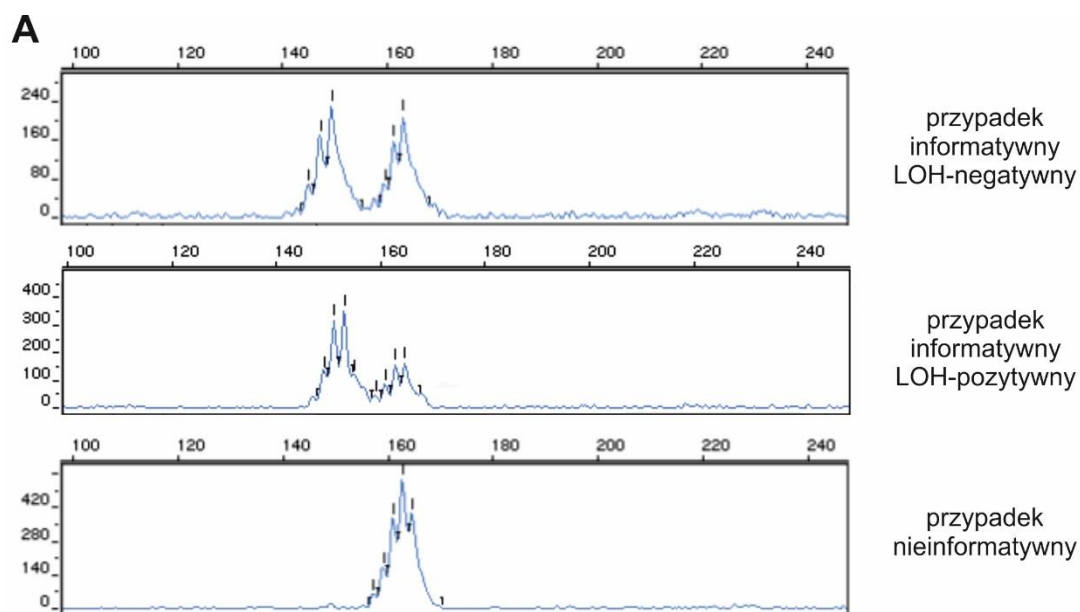
Powyższa analiza wykazała istnienie silnej ujemnej korelacji ($R=-0,703$; $p<0,001$) pomiędzy poziomem metylacji genu *TGFBR3* a ilością jego transkryptu wyłącznie w przypadku materiału prawidłowego (**Ryc. 5.17. A-B.**). Podobnie, w przypadku genu *GATA3*, wykazano istnienie silnej ujemnej korelacji ($R=-0,669$; $p<0,001$) pomiędzy poziomem metylacji genu a poziomem ekspresji jego mRNA (**Ryc. 5.17. E-F.**). Ekspresja genu *TGFBR3* była natomiast silnie dodatnio skorelowana z ekspresją genu *GATA3* w przypadku preparatów prawidłowych ($R=0,808$; $p<0,001$), natomiast w przypadku raka endometrium zaobserwowana korelacja była słabsza ($R=0,420$; $p<0,001$) (**Ryc. 5.17. C-D.**).

5.7. Ocena utraty heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3*

Analizie LOH w regionie genu *TGFBR3* poddano 48 preparatów DNA wyizolowanych z raka endometrium oraz 48 preparatów DNA wyizolowanych z materiału prawidłowego otrzymanego od tych samych pacjentek. Utratę heterozygotyczności oceniano za pomocą analizy długości produktów reakcji PCR trzech markerów mikrosatelitarnych zlokalizowanych w *locus* genu *TGFBR3*, tj. D1S188, D1S435 oraz D1S1588.

Rycina 5.18. A. przedstawia przykładowy wykres fluorescencji analizowanych produktów reakcji PCR. Wyniki analizy LOH w badanym materiale nowotworowym zobrazowano na **rycinie 5.18. B.** Utratę heterozygotyczności stwierdzono w 54% (15/28), 36% (8/22) i 35% (7/20) przypadków informatywnych odpowiednio dla markerów mikrosatelitarnych D1S188, D1S435 oraz D1S1588 (**Tab. 5.1.**). Stwierdzono, że 64% (25/39) przypadków informatywnych, co odpowiadało 52% (25/48) wszystkich przebadanych preparatów raka endometrium wykazywało utratę heterozygotyczności, w co najmniej jednym z ocenianych markerów mikrosatelitarnych. Dodatkowo w 10% (5/48) analizowanych przypadków raka endometrium zaobserwowano utratę heterozygotyczności w dwóch z analizowanych markerów mikrosatelitarnych (preparaty nr 25, 29, 31, 35, 47). W przypadku markerów mikrosatelitarnych D1S188 oraz D1S1588 stwierdzono niestabilność mikrosatelitarną odpowiednio w preparatach nr 6 i 32 oraz preparacie nr 27.

Analiza występowania utraty heterozygotyczności w raku endometrium wykazała brak statystycznie istotnych różnic w odniesieniu do parametrów kliniczno-patologicznych. Nie stwierdzono występowania korelacji między stopniem zaawansowania klinicznego wg skali FIGO, stopniem złośliwości komórek nowotworowych, naciekaniem mięśniówki trzonu macicy, czy zajęciem powierzchni naczyniowych, a także wiekiem pacjentek w chwili rozpoznania, a zwiększoną częstością występowania utraty heterozygotyczności (**Tab. 5.2.**).



Rycina 5.18. Utrata heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3* oceniana za pomocą markerów mikrosatelitarnych D1S188, D1S435 oraz D1S1588; A. Przykładowy rozdział otrzymany dla produktów amplifikacji w obecności znaczników fluorescencyjnych; B. Graficzna reprezentacja utraty heterozygotyczności w analizowanych preparatach raka endometrium (n=48 par preparatów).

Tabela 5.1. Częstość występowania utraty heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3* w raku endometrium oceniana za pomocą markerów mikrosatelitarnych D1S188, D1S435 oraz D1S1588.

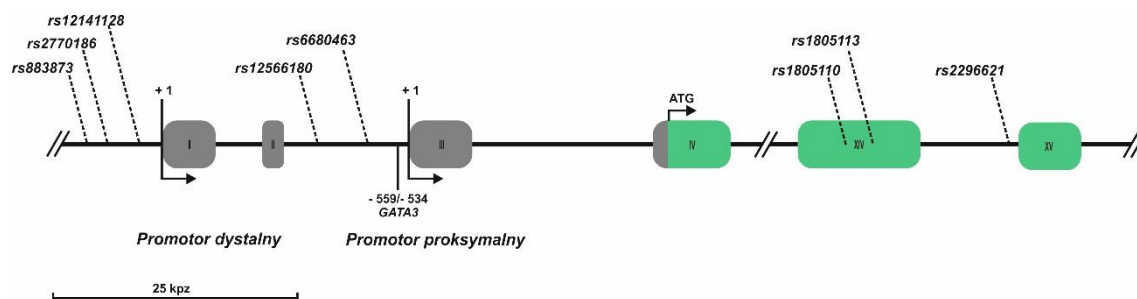
Marker	Informatywne/wszystkie przypadki	LOH (%)
D1S188	28/48	15/28 (54%)
D1S435	22/48	8/22 (36%)
D1S1588	20/48	7/20 (35%)

Tabela 5.2. Utrata heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3* a parametry kliniczno-patologiczne analizowanych preparatów raka endometrium.

PARAMETRY KLINICZNO- PATOLOGICZNE	MARKER MIKROSATELITARNY								
	D1S188			D1S435			D1S1588		
	PRZYPADKI INFORMATYWNE LOH-negatywne	LOH-pozytywne	<i>p</i>	PRZYPADKI INFORMATYWNE LOH-negatywne	LOH-pozytywne	<i>p</i>	PRZYPADKI INFORMATYWNE LOH-negatywne	LOH-pozytywne	<i>p</i>
	13	15	-	14	8	-	13	7	-
FIGO									
I	4	5		7	4		5	3	
II	6	6	0,85	5	1	0,49	4	3	0,70
III	1	3		1	1		3	0	
IV	2	1		1	2		1	1	
G									
G1	2	4		5	1		1	2	
G2	9	11	0,41	7	6	0,58	11	4	0,33
G3	2	0		2	1		1	1	
Naciekanie mięśniówki trzonu macicy									
< 1/2	5	6		7	5		6	3	
> 1/2	8	9	>0,99	7	3	0,67	7	4	>0,99
Zajęcie powierzchni naczyniowych									
bez zajęcia	10	11		11	6		10	6	
z zajęciem	3	4	>0,99	3	2	0,61	3	1	>0,99
Wiek rozpoznania									
< 60	5	6		7	2		6	1	
≥ 60	8	9	>0,99	7	6	0,38	7	6	0,33

5.8. Ocena polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu *TGFBR3*

Analizą objęto ogółem 123 przypadki raka endometrium oraz 248 preparatów krwi obwodowej pochodzących od kobiet u których nie zdiagnozowano choroby nowotworowej, które stanowiły grupę kontrolną. Na podstawie analizy bioinformatycznej badaniami objęto 8 jednonukleotydowych miejsc polimorficznych w *locus* genu *TGFBR3*, w tym trzy zlokalizowane w regionie regulatorowym po stronie 5' genu, a pozostałe pięć w regionie kodującym, tj. *rs883873* (upstream), *rs2770186* (upstream), *rs12141128* (upstream), *rs12566180* (intron), *rs6680463* (intron), *rs1805110* (ekson), *rs1805113* (ekson), *rs2296621* (intron) (Ryc. 5.19.). Badane polimorfizmy wytypowane zostały na podstawie istotnie zmiennej częstości występowania w populacji kaukaskiej. Genotypowanie przeprowadzono przy użyciu komercyjnych sond fluorescencyjnych TaqMan® (Applied Biosystems, USA) przy użyciu techniki Real-time PCR.

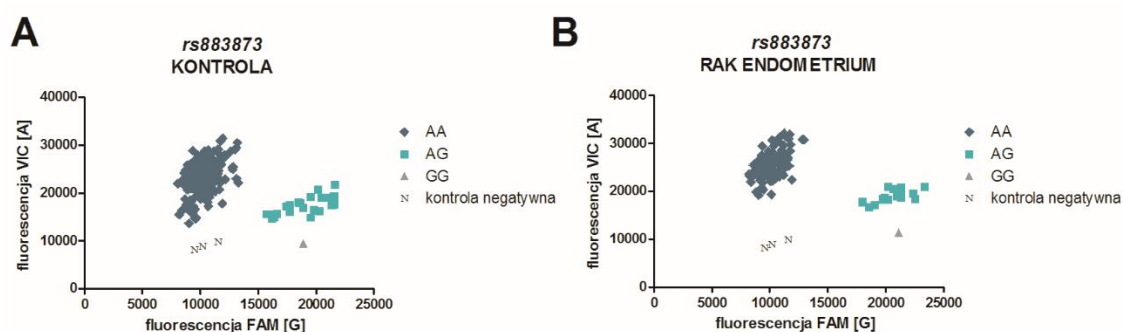


Rycina 5.19. Położenie badanych miejsc polimorficznych genu *TGFBR3* (na podstawie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

5.8.1. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w regionie promotorowym genu *TGFBR3*

Analiza miejsca polimorficznego rs883873

Rycina 5.20. przedstawia rozkład fluorescencji zaobserwowany w trakcie genotypowania miejsca polimorficznego *rs883873* (g.92380302A>G). W **tabeli 5.3.** zestawiono rozkład częstości jego genotypów oraz alleli, jak również wyniki przeprowadzonej analizy ilorazu szans (OR).



Rycina 5.20. Genotypowanie miejsca polimorficznego *rs883873* genu *TGFBR3*.

Tabela 5.3. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs883873* genu *TGFBR3* w raku endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	RAK ENDOMETRIUM n=123 (%)	KONTROLA n=248 (%)	OR	95%CI	p	HWE ^a
AA	103 (83,7%)	200 (80,6%)	1,236	0,697 – 2,193	0,469	
AG	19 (15,4%)	47 (19,0%)	0,781	0,436 – 1,400	0,407	0,484
GG	1 (0,8%)	1 (0,4%)	2,025	0,126 – 32,644	0,619	
AG+GG ^b			0,809	0,456 – 1,435	0,467	
AG+AA ^c			0,494	0,031 – 7,964	1,000	
A	225 (91,5%)	447 (90,1%)	1,182	0,684 – 2,043	0,548	
G	21 (8,5%)	49 (9,9%)	0,846	0,490 – 1,461	0,548	

^azgówność w rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^bmodel dominujący; ^cmodel recesywny

Analiza statystyczna wykazała brak zwiększonego ryzyka zachorowania na raka endometrium w przypadku któregośkolwiek z wariantów genotypowych, jak również wariantów allelicznych miejsca polimorficznego *rs883873* (**Tab. 5.3.**). W przypadku oceny związku pomiędzy częstością występowania polimorfizmu *rs883873* a parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału nowotworowego, stwierdzono istotny statystycznie wzrost częstości występowania allelu G w stadiach FIGO III/IV raka endometrium (OR – 2,735;

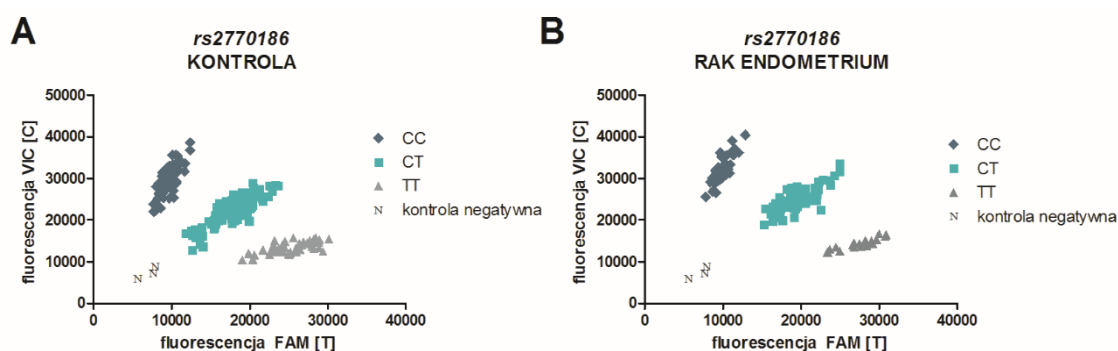
95%CI 1,003 – 7,458; $p = 0,049$) (Tab. 5.4.). Jednocześnie zaobserwowano brak związku polimorfizmu *rs883873* z pozostałymi parametrami kliniczno-patologicznymi, tj. stopniem złośliwości histologicznej komórek nowotworowych, naciekaniem mięśniówki trzonu macicy, czy zajęciem powierzchni naczyniowych, a także wiekiem pacjentek w chwili diagnozy (Tab. 5.4.).

Tabela 5.4. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs883873* genu *TGFBR3* z uwzględnieniem parametrów kliniczno-patologicznych raka endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	FIGO I/II (%)	FIGO III/IV (%)	OR	95%CI	<i>p</i>
AA	88 (86,3%)	15 (71,4%)	0,398	0,132 – 1,197	0,101
AG	14 (13,7%)	5 (23,8%)	1,964	0,621 – 6,214	0,251
GG	0 (0,0%)	1 (4,8%)	–	–	–
↓ A	190 (93,1%)	35 (83,3%)	0,366	0,134 – 0,997	0,049
↑ G	14 (6,9%)	7 (16,7%)	2,735	1,003 – 7,458	0,049
GENOTYP/ ALLEL	STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI		OR	95%CI	<i>p</i>
	G1/2 (%)	G3 (%)			
AA	92 (83,6%)	11 (84,6%)	1,076	0,220 – 5,272	0,928
AG	17 (15,5%)	2 (15,4%)	0,995	0,202 – 4,892	0,995
GG	1 (0,9%)	0 (0,0%)	–	–	–
A	201 (91,4%)	24 (92,3%)	1,133	0,250 – 5,128	0,871
G	19 (8,6%)	2 (7,7%)	0,883	0,195 – 3,996	0,871
GENOTYP/ ALLEL	NACIEKANIE MIĘŚNIÓWKI TRZONU MACICY		OR	95%CI	<i>p</i>
	< 1/2 (%)	> 1/2 (%)			
AA	11 (16,9%)	5 (8,6%)	0,538	0,203 – 1,420	0,213
AG	36 (55,4%)	36 (62,1%)	2,161	0,788 – 5,930	0,134
GG	18 (27,7%)	17 (29,3%)	–	–	–
A	58 (44,6%)	46 (39,7%)	0,647	0,262 – 1,596	0,344
G	72 (55,4%)	70 (60,3%)	1,547	0,627 – 3,817	0,344
GENOTYP/ ALLEL	ZAJĘCIE POWIERZCHNI NACZYNIOWYCH		OR	95%CI	<i>p</i>
	NIE (%)	TAK (%)			
AA	55 (87,3%)	13 (72,2%)	0,433	0,135 – 1,392	0,160
AG	7 (11,1%)	5 (27,8%)	2,500	0,772 – 8,095	0,126
GG	1 (1,6%)	0 (0,0%)	–	–	–
A	117 (92,9%)	31 (86,1%)	0,513	0,174 – 1,510	0,226
G	9 (7,1%)	5 (13,9%)	1,949	0,662 – 5,735	0,226
GENOTYP/ ALLEL	WIEK PACJENTEK		OR	95%CI	<i>p</i>
	< 60 (%)	≥ 60 (%)			
AA	47 (87,0%)	56 (81,2%)	0,642	0,237 – 1,739	0,383
AG	7 (13,0%)	12 (17,4%)	1,414	0,515 – 3,877	0,501
GG	0 (0,0%)	1 (1,4%)	–	–	–
A	101 (93,5%)	124 (89,9%)	0,616	0,239 – 1,585	0,315
G	7 (6,5%)	14 (10,1%)	1,624	0,631 – 4,181	0,315

Analiza miejsca polimorficznego rs2770186

Rycina 5.21. przedstawia rozkład fluorescencji zaobserwowany w trakcie genotypowania miejsca polimorficznego *rs2770186* (g.92378843T>C). W **tabeli 5.5.** zestawiono rozkład częstości jego genotypów oraz alleli, jak również wyniki przeprowadzonej analizy ilorazu szans (OR).



Rycina 5.21. Genotypowanie miejsca polimorficznego *rs2770186* genu *TGFB3*.

Tabela 5.5. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs2770186* genu *TGFB3* w raku endometriumu.

GENOTYP/ ALLEL	RAK ENDOMETRIUM n=123 (%)	KONTROLA n=248 (%)	OR	95%CI	p	HWE ^a
TT	16 (13,0%)	46 (18,5%)	0,657	0,355 – 1,215	0,180	
TC	72 (58,5%)	120 (48,4%)	0,506	0,973 – 2,330	0,066	0,857
CC	35 (28,5%)	82 (33,1%)	0,805	0,502 – 1,292	0,369	
TC+CC ^b			1,523	0,823 – 2,818	0,179	
TC+TT ^c			1,242	0,774 – 1,993	0,368	
T	104 (42,3%)	212 (42,7%)	0,980	0,713 – 1,348	0,901	
C	142 (57,7%)	284 (57,3%)	1,020	0,742 – 1,403	0,901	

^azgówność w rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^bmodel dominujący; ^cmodel recesywny

Analiza statystyczna wykazała brak zwiększonego ryzyka zachorowania na raka endometriumu w przypadku któregośkolwiek z wariantów genotypowych, jak również wariantów allelicznych miejsca polimorficznego *rs2770186* (**Tab. 5.5.**). W przypadku oceny związku pomiędzy częstością występowania polimorfizmu *rs2770186* a parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału nowotworowego, stwierdzono istotny statystycznie spadek częstości występowania genotypu TC w raku endometriumu o wysokim stopniu złośliwości komórek nowotworowych G3 (OR – 0,275; 95%CI 0,080 – 0,948; $p = 0,041$) (**Tab. 5.6.**). Jednocześnie zaobserwowano brak związku polimorfizmu *rs2770186*

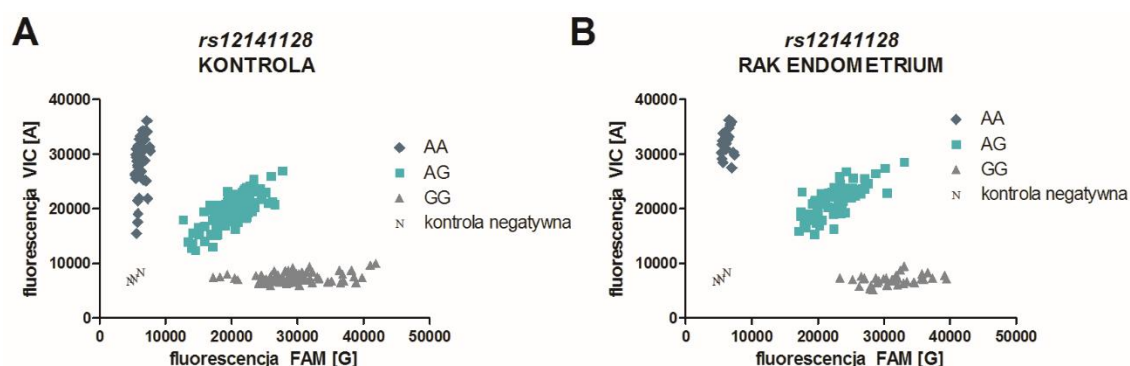
z pozostałymi parametrami kliniczno-patologicznymi, tj. stadium zaawansowania raka ocenianego w skali FIGO, naciekaniem mięśniówki trzonu macicy, czy zajęciem powierzchni naczyniowych, a także wiekiem pacjentek w chwili diagnozy (Tab. 5.6.).

Tabela 5.6. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs2770186* genu *TGFB3* z uwzględnieniem parametrów kliniczno-patologicznych raka endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	FIGO I/II (%)	FIGO III/IV (%)	OR	95%CI	p
TT	15 (14,7%)	1 (4,8%)	0,290	0,036 – 2,325	0,244
TC	56 (54,9%)	12 (57,1%)	2,629	0,895 – 7,719	0,079
CC	31 (30,4%)	8 (38,1%)	0,539	0,168 – 1,733	0,300
T	86 (42,2%)	14 (33,3%)	1,036	0,489 – 2,196	0,926
C	118 (57,8%)	28 (66,7%)	0,965	0,455 – 2,044	0,926
GENOTYP/ ALLEL	STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI		OR	95%CI	p
	G1/2 (%)	G3 (%)			
TT	13 (11,8%)	3 (23,1%)	2,238	0,544 – 9,206	0,264
↓ TC	68 (61,8%)	4 (30,8%)	0,275	0,080 – 0,948	0,041
CC	29 (26,4%)	6 (46,2%)	2,394	0,743 – 7,714	0,144
T	94 (42,7%)	10 (38,5%)	0,802	0,317 – 2,032	0,642
C	126 (57,3%)	16 (61,5%)	1,247	0,492 – 3,157	0,642
GENOTYP/ ALLEL	NACIEKANIE MIĘŚNIÓWKI TRZONU MACICY		OR	95%CI	p
	< 1/2 (%)	> 1/2 (%)			
TT	11 (16,9%)	5 (8,6%)	0,463	0,151 – 1,424	0,179
TC	36 (55,4%)	36 (62,1%)	1,318	0,641 – 2,712	0,453
CC	18 (27,7%)	17 (29,3%)	1,083	0,494 – 2,371	0,843
T	58 (44,6%)	46 (39,7%)	0,775	0,438 – 1,371	0,381
C	72 (55,4%)	70 (60,3%)	1,291	0,729 – 2,285	0,381
GENOTYP/ ALLEL	ZAJĘCIE POWIERZCHNI NACZYNIOWYCH		OR	95%CI	p
	NIE (%)	TAK (%)			
TT	8 (12,7%)	2 (11,1%)	0,813	0,168 – 3,921	0,796
TC	34 (54,0%)	12 (66,7%)	1,500	0,523 – 4,301	0,451
CC	21 (33,3%)	4 (22,2%)	0,682	0,208 – 2,237	0,528
T	50 (39,7%)	16 (44,4%)	1,138	0,512 – 2,529	0,75
C	76 (60,3%)	20 (55,6%)	0,878	0,395 – 1,951	0,75
GENOTYP/ ALLEL	WIEK PACJENTEK		OR	95%CI	p
	< 60 (%)	≥ 60 (%)			
TT	7 (13,0%)	9 (13,0%)	1,007	0,349 – 2,904	0,989
TC	29 (53,7%)	43 (62,3%)	1,426	0,692 – 2,939	0,337
CC	18 (33,3%)	17 (24,6%)	0,654	0,298 – 1,437	0,290
T	43 (39,8%)	61 (44,2%)	1,253	0,706 – 2,224	0,441
C	65 (60,2%)	77 (55,8%)	0,798	0,450 – 1,416	0,441

Analiza miejsca polimorficznego rs12141128

Rycina 5.22. przedstawia rozkład fluorescencji zaobserwowany w trakcie genotypowania miejsca polimorficznego rs12141128 (g.92373747A>G). W tabeli 5.7. zestawiono rozkład częstości jego genotypów oraz alleli, jak również wyniki przeprowadzonej analizy ilorazu szans (OR).



Rycina 5.22. Genotypowanie miejsca polimorficznego rs12141128 genu *TGFB3*.

Tabela 5.7. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego rs12141128 genu *TGFB3* w raku endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	RAK ENDOMETRIUM n=123 (%)	KONTROLA n=248 (%)	OR	95%CI	p	HWE ^a
AA	17 (13,8%)	49 (19,8%)	0,651	0,357 – 1,187	0,161	
AG	71 (57,7%)	118 (47,6%)	1,504	0,973 – 2,326	0,066	0,611
GG	35 (28,5%)	81 (32,7%)	0,820	0,511 – 1,316	0,411	
AG+GG ^b			1,535	0,843 – 2,797	0,159	
AG+AA ^c			1,220	0,760 – 1,957	0,410	
A	105 (42,7%)	216 (43,5%)	0,964	0,704 – 1,321	0,819	
G	141 (57,3%)	280 (56,5%)	1,037	0,757 – 1,421	0,819	

^azgodność w rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^bmodel dominujący; ^cmodel recesywny

Analiza statystyczna wykazała brak zwiększonego ryzyka zachorowania na raka endometrium w przypadku któregośkolwiek z wariantów genotypowych, jak również wariantów allelicznych miejsca polimorficznego rs12141128 (Tab. 5.7.). W przypadku oceny związku pomiędzy częstością występowania polimorfizmu rs12141128 a parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału nowotworowego, stwierdzono istotny statystycznie spadek częstości występowania genotypu AG w raku endometrium o wysokim stopniu złośliwości komórek nowotworowych G3 (OR – 0,285; 95%CI 0,083 – 0,948; $p=0,047$) (Tab. 5.8.). Jednocześnie zaobserwowano brak związku polimorfizmu rs12141128

z pozostałymi parametrami kliniczno-patologicznymi, tj. stadium zaawansowania raka ocenianego w skali FIGO, naciekaniem mięśniówki trzonu macicy, czy zajęciem powierzchni naczyniowych, a także wiekiem pacjentek w chwili diagnozy (Tab. 5.8.)

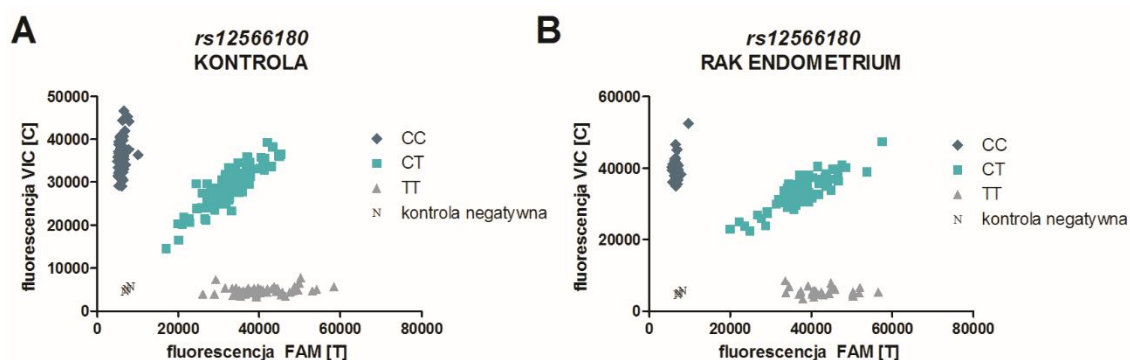
Tabela 5.8. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego rs12141128 genu *TGFB3* z uwzględnieniem parametrów kliniczno-patologicznych raka endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	FIGO I/II (%)	FIGO III/IV (%)	OR	95%CI	p
AA	15 (14,7%)	2 (9,5%)	0,611	0,129 – 2,896	0,534
AG	56 (54,9%)	15 (71,4%)	2,054	0,738 – 5,717	0,168
GG	31 (30,4%)	4 (19,0%)	0,539	0,168 – 1,733	0,300
A	86 (42,2%)	19 (45,2%)	1,165	0,556 – 2,443	0,685
G	118 (57,8%)	23 (54,8%)	0,858	0,409 – 1,798	0,685
GENOTYP/ ALLEL	STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI		OR	95%CI	p
	G1/2 (%)	G3 (%)			
AA	14 (12,7%)	3 (23,1%)	2,057	0,504 – 8,399	0,315
↓ AG	67 (60,9%)	4 (30,8%)	0,285	0,083 – 0,984	0,047
GG	29 (26,4%)	6 (46,2%)	2,394	0,743 – 7,714	0,144
A	95 (43,2%)	10 (38,5%)	0,788	0,315 – 1,975	0,612
G	125 (56,8%)	16 (61,5%)	1,268	0,506 – 3,178	0,612
GENOTYP/ ALLEL	NACIEKANIE MIĘŚNIÓWKI TRZONU MACICY		OR	95%CI	p
	< 1/2 (%)	> 1/2 (%)			
AA	12 (18,5%)	5 (8,6%)	0,417	0,137 – 1,265	0,122
AG	35 (53,8%)	36 (62,1%)	1,403	0,682 – 2,883	0,357
GG	18 (27,7%)	17 (29,3%)	1,083	0,494 – 2,371	0,843
A	59 (45,4%)	46 (39,7%)	0,750	0,426 – 1,319	0,318
G	71 (54,6%)	70 (60,3%)	1,333	0,758 – 2,345	0,318
GENOTYP/ ALLEL	ZAJĘCIE POWIERZCHNI NACZYNIOWYCH		OR	95%CI	p
	NIE (%)	TAK (%)			
AA	9 (14,3%)	2 (11,1%)	0,750	0,156 – 3,599	0,719
AG	33 (52,4%)	12 (66,7%)	1,559	0,544 – 4,470	0,408
GG	21 (33,3%)	4 (22,2%)	0,682	0,208 – 2,237	0,528
A	51 (40,5%)	16 (44,4%)	1,108	0,504 – 2,436	0,799
G	75 (59,5%)	20 (55,6%)	0,902	0,411 – 1,984	0,799
GENOTYP/ ALLEL	WIEK PACJENTEK		OR	95%CI	p
	< 60 (%)	≥ 60 (%)			
AA	7 (13,0%)	10 (14,5%)	1,138	0,403 – 3,217	0,807
AG	29 (53,7%)	42 (60,9%)	1,341	0,652 – 2,758	0,425
GG	18 (33,3%)	17 (24,6%)	0,654	0,298 – 1,437	0,290
A	43 (39,8%)	62 (44,9%)	1,292	0,733 – 2,279	0,376
G	65 (60,2%)	76 (55,1%)	0,774	0,439 – 1,365	0,376

5.8.2. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w regionie kodującym genu *TGFBR3*

Analiza miejsca polimorficznego rs12566180

Rycina 5.23. przedstawia rozkład fluorescencji zaobserwowany w trakcie genotypowania miejsca polimorficznego *rs12566180* (c.-114+2392C>T), podczas gdy w **tabeli 5.9.** zestawiono rozkład częstości jego genotypów oraz alleli, jak również wyniki przeprowadzonej analizy ilorazu szans (OR).



Rycina 5.23. Genotypowanie miejsca polimorficznego *rs12566180* genu *TGFBR3*.

Tabela 5.9. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs12566180* genu *TGFBR3* w raku endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	RAKI ENDOMETRIUM n=123 (%)	KONTROLA n=248 (%)	OR	95%CI	p	HWE ^a
CC	24 (19,5%)	68 (27,4%)	0,642	0,379 – 1,086	0,098	
↑ CT	69 (56,1%)	109 (44,0%)	1,629	1,054 – 2,519	0,028	0,057
TT	30 (24,4%)	71 (28,6%)	0,804	0,490 – 1,319	0,388	
CT+TT ^b			1,558	0,921 – 2,637	0,097	
CT+CC ^c			1,244	0,760 – 2,040	0,386	
C	117 (47,6%)	245 (49,4%)	0,932	0,690 – 1,258	0,645	
T	129 (52,4%)	251 (50,6%)	1,073	0,795 – 1,449	0,645	

^azgodność w rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^bmodel dominujący; ^cmodel recesywny

Analiza statystyczna wykazała zwiększone ryzyko zachorowania na raka endometrium w przypadku genotypu CT (OR – 1,629; 95%CI 1,054 – 2,519; $p=0,028$) (**Tab. 5.9.**). Jednocześnie stwierdzono brak związku pomiędzy częstością występowania polimorfizmu *rs12566180* a parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału nowotworowego, tj. stadium zaawansowania raka ocenianego w skali FIGO, stopniem złośliwości komórek nowotworowych, naciekaniem

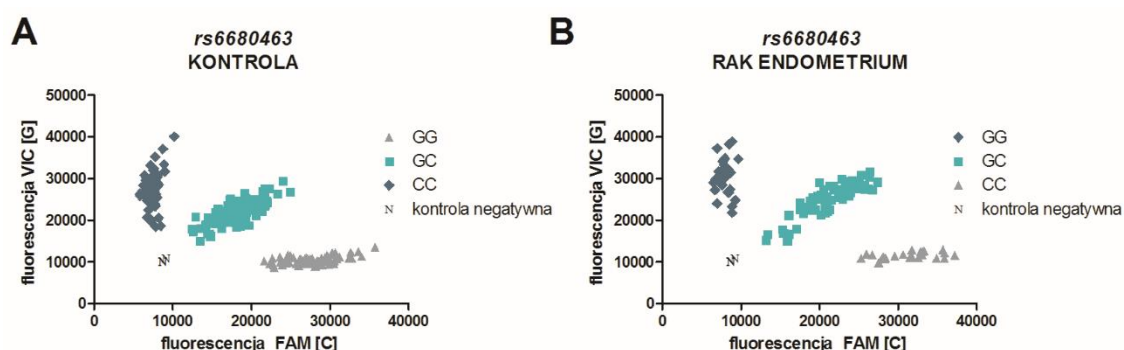
mięśniówki trzonu macicy, czy zajęciem powierzchni naczyniowych, a także wiekiem pacjentek w chwili diagnozy (Tab. 5.10.).

Tabela 5.10. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego rs12566180 genu *TGFB3* z uwzględnieniem parametrów kliniczno-patologicznych raka endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	FIGO I/II (%)		FIGO III/IV (%)		OR	95%CI	p
CC	19	86,3%	5	23,8%	1,365	0,445 – 4,189	0,586
CT	55	13,7%	14	66,7%	1,709	0,637 – 4,587	0,287
TT	28	0,0%	2	9,5%	0,278	0,061 – 1,273	0,099
C	190	93,1%	35	83,3%	1,710	0,826 – 3,540	0,148
T	14	6,9%	7	16,7%	0,585	0,282 – 1,211	0,148
GENOTYP/ ALLEL	STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI				OR	95%CI	p
	G1/2 (%)		G3 (%)				
CC	21	19,1%	3	23,1%	1,271	0,321 – 5,029	0,732
CT	65	59,1%	4	30,8%	0,308	0,089 – 1,061	0,062
TT	24	21,8%	6	46,2%	3,071	0,943 – 10,001	0,062
C	107	48,6%	10	38,5%	0,621	0,254 – 1,519	0,297
T	113	51,4%	16	61,5%	1,609	0,658 – 3,934	0,297
GENOTYP/ ALLEL	NACIEKANIE MIĘŚNIÓWKI TRZONU MACICY				OR	95%CI	p
	< 1/2 (%)		> 1/2 (%)				
CC	17	26,2%	7	12,1%	0,388	0,148 – 1,017	0,054
CT	32	49,2%	37	63,8%	1,817	0,881 – 3,745	0,106
TT	16	24,6%	14	24,1%	0,974	0,427 – 2,223	0,951
C	66	50,8%	51	44,0%	0,730	0,425 – 1,256	0,256
T	64	49,2%	65	56,0%	1,369	0,796 – 2,356	0,256
GENOTYP/ ALLEL	ZAJĘCIE POWIERZCHNI NACZYNIOWYCH				OR	95%CI	p
	NIE (%)		TAK (%)				
CC	12	19,0%	3	16,7%	0,800	0,212 – 3,021	0,742
CT	35	55,6%	11	61,1%	1,273	0,458 – 3,541	0,643
TT	16	25,4%	4	22,2%	0,868	0,262 – 2,872	0,817
C	59	46,8%	17	47,2%	0,982	0,461 – 2,093	0,962
T	67	53,2%	19	52,8%	1,018	0,478 – 2,171	0,962
GENOTYP/ ALLEL	WIEK PACJENTEK				OR	95%CI	p
	< 60 (%)		≥ 60 (%)				
CC	11	20,4%	13	18,8%	0,907	0,370 – 2,223	0,832
CT	28	51,9%	41	59,4%	1,36	0,663 – 2,788	0,402
TT	15	27,8%	15	21,7%	0,722	0,316 – 1,649	0,440
C	50	46,3%	67	48,6%	1,109	0,646 – 1,902	0,707
T	58	53,7%	71	51,4%	0,902	0,526 – 1,547	0,707

Analiza miejsca polimorficznego rs6680463

Rycina 5.24. przedstawia rozkład fluorescencji zaobserwowany w trakcie genotypowania miejsca polimorficznego rs6680463 (c.-114+7008C>G). W **tabeli 5.11.** zestawiono rozkład częstości jego genotypów oraz alleli, jak również wyniki przeprowadzonej analizy ilorazu szans (OR).



Rycina 5.24. Genotypowanie miejsca polimorficznego rs6680463 genu *TGFBR3*.

Tabela 5.11. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego rs6680463 genu *TGFBR3* w raku endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	RAK ENDOMETRIUM n=123 (%)		KONTROLA n=248 (%)		OR	95%CI	p	HWE ^a
GG	29	23,6%	68	27,4%	0,817	0,495 – 1,348	0,428	
↑ GC	71	57,7%	112	45,2%	1,658	1,072 – 2,565	0,023	0,128
CC	23	18,7%	68	27,4%	0,609	0,358 – 1,037	0,068	
GC+CC ^b					1,225	0,742 – 2,021	0,427	
GC+GG ^c					1,643	0,965 – 2,797	0,066	
G	129	52,4%	248	50,0%	1,101	0,812 – 1,493	0,534	
C	117	47,6%	248	50,0%	0,908	0,67 – 1,231	0,534	

^azgodność w rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^bmodel dominujący; ^cmodel recesywny

Analiza statystyczna wykazała zwiększone ryzyko zachorowania na raka endometrium w przypadku genotypu GC (OR – 1,658; 95%CI 1,072 – 2,565; $p=0,023$) (**Tab. 5.11.**). Występowanie genotypu GC związane jest z niższą – G1/2 złośliwością komórek nowotworowych (OR – 0,285; 95%CI 0,083 – 0,984; $p=0,047$). Natomiast genotyp GG w sposób istotny zwiększa ryzyko występowania bardziej agresywnych postaci raka endometrium o stopniu złośliwości G3 (OR – 3,242; 95%CI% 1,000 – 10,586; $p=0,050$) Jednocześnie stwierdzono brak związku pomiędzy częstością występowania polimorfizmu rs6680463 a pozostałymi parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału, tj. stadium

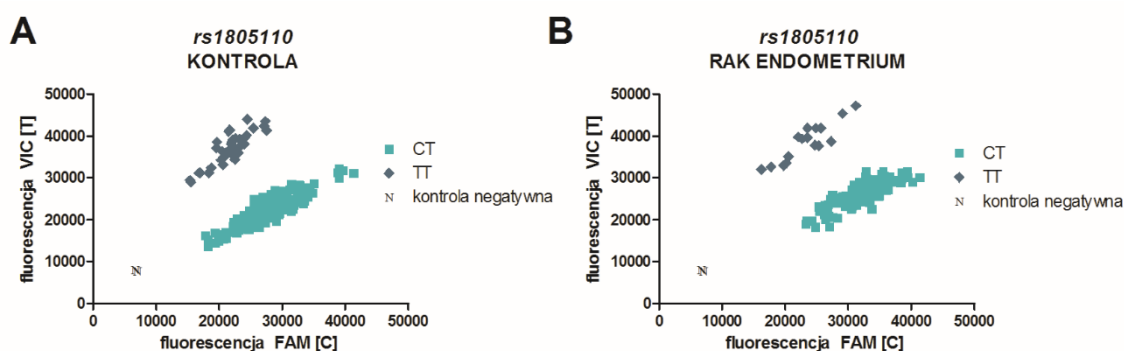
zaawansowania raka ocenianego w skali FIGO, naciekaniem mięśniówki trzonu macicy, czy zajęciem powierzchni naczyń i naczyń, a także wiekiem pacjentek w chwili diagnozy (Tab. 5.12.).

Tabela 5.12. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs6680463* genu *TGFB3* z uwzględnieniem parametrów kliniczno-patologicznych raka endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	FIGO I/II (%)	FIGO III/IV (%)	OR	95%CI	p
GG	27 (26,5%)	2 (9,5%)	0,292	0,064 – 1,340	0,113
GC	56 (54,9%)	15 (71,4%)	2,054	0,738 – 5,717	0,168
CC	19 (18,6%)	4 (19,0%)	1,028	0,310 – 3,405	0,964
G	110 (53,9%)	19 (45,2%)	0,66	0,317 – 1,374	0,266
C	94 (46,1%)	23 (54,8%)	1,516	0,728 – 3,158	0,266
GENOTYP/ ALLEL	STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI		OR	95%CI	p
	G1/2 (%)	G3 (%)			
↑ GG	23 (20,9%)	6 (46,2%)	3,242	1,000 – 10,586	0,050
↓ GC	67 (60,9%)	4 (30,8%)	0,285	0,083 – 0,984	0,047
CC	20 (18,2%)	3 (23,1%)	1,350	0,340 – 5,356	0,670
G	113 (51,4%)	16 (61,5%)	1,638	0,659 – 4,072	0,288
C	107 (48,6%)	10 (38,5%)	0,610	0,246 – 1,517	0,288
GENOTYP/ ALLEL	NACIEKANIE MIĘŚNIÓWKI TRZONU MACICY		OR	95%CI	p
	< 1/2 (%)	> 1/2 (%)			
GG	16 (24,6%)	13 (22,4%)	0,885	0,383 – 2,042	0,774
GC	33 (50,8%)	38 (65,5%)	1,842	0,890 – 3,815	0,100
CC	16 (24,6%)	7 (12,1%)	0,420	0,159 – 1,110	0,080
G	65 (50,0%)	64 (55,2%)	1,281	0,739 – 2,220	0,378
C	65 (50,0%)	52 (44,8%)	0,781	0,450 – 1,354	0,378
GENOTYP/ ALLEL	ZAJĘCIE POWIERZCHNI NACZYŃIOWYCH		OR	95%CI	p
	NIE (%)	TAK (%)			
GG	16 (25,4%)	4 (22,2%)	0,914	0,276 – 3,031	0,883
GC	36 (57,1%)	11 (61,1%)	1,179	0,424 – 3,280	0,753
CC	11 (17,5%)	3 (16,7%)	0,850	0,224 – 3,220	0,811
G	68 (54,0%)	19 (52,8%)	1,019	0,471 – 2,204	0,962
C	58 (46,0%)	17 (47,2%)	0,981	0,454 – 2,122	0,962
GENOTYP/ ALLEL	WIEK PACJENTEK		OR	95%CI	p
	< 60 (%)	≥ 60 (%)			
GG	15 (27,8%)	14 (20,3%)	0,662	0,287 – 1,527	0,333
GC	28 (51,9%)	43 (62,3%)	1,536	0,746 – 3,163	0,245
CC	11 (20,4%)	12 (17,4%)	0,823	0,332 – 2,042	0,674
G	58 (53,7%)	71 (51,4%)	0,898	0,518 – 1,557	0,702
C	50 (46,3%)	67 (48,6%)	1,113	0,642 – 1,930	0,702

Analiza miejsca polimorficznego rs1805110

Rycina 5.25. przedstawia rozkład fluorescencji zaobserwowany w trakcie genotypowania miejsca polimorficznego rs1805110 (p.Ser15Phe). W **tabeli 5.13.** zestawiono rozkład częstości jego genotypów oraz alleli, jak również wyniki przeprowadzonej analizy ilorazu szans (OR).



Rycina 5.25. Genotypowanie miejsca polimorficznego rs1805110 genu *TGFB3*.

Tabela 5.13. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego rs1805110 genu *TGFB3* w raku endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	RAK ENDOMETRIUM n=123 (%)	KONTROLA n=248 (%)	OR	95%CI	p	HWE ^a
CC	0 (0,0%)	0 (0,0%)	–	–	–	
CT	107 (86,3%)	212 (85,5%)	1,136	0,603 – 2,139	0,694	<0,001
TT	16 (13,7%)	36 (14,5%)	0,881	0,468 – 1,659	0,694	
CT+TT ^b			–	–	–	
CT+CC ^c			1,136	0,603 – 2,139	0,689	
C	107 (43,5%)	212 (42,7%)	1,136	0,603 – 2,139	0,694	
T	139 (56,5%)	284 (57,3%)	0,881	0,468 – 1,659	0,694	

^azgodność w rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^bmodel dominujący; ^cmodel recesywny

Analiza statystyczna wykazała brak zwiększonego ryzyka zachorowania na raka endometrium w przypadku któregośkolwiek z wariantów genotypowych, jak również wariantów allelicznych miejsca polimorficznego rs1805110 (**Tab. 5.13.**). Ocena związku pomiędzy częstością występowania polimorfizmu rs1805110 a parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału wykazała brak istotnych statystycznie różnic w częstości występowania wariantów polimorficznych w odniesieniu do parametrów kliniczno-patologicznych, tj. stadium zaawansowania raka ocenianego w skali FIGO, stopnia złośliwości komórek nowotworowych, naciekania mięśniówki trzonu macicy, czy zajęcia

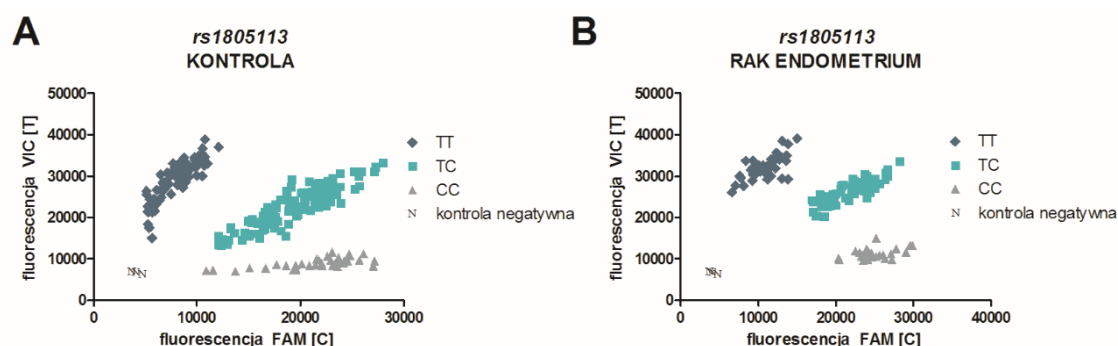
powierzchni naczyniowych, a także wieku pacjentek w chwili diagnozy (Tab. 5.14.).

Tabela 5.14. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs1805110* genu *TGFB3* z uwzględnieniem parametrów kliniczno-patologicznych raka endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	FIGO I/II (%)	FIGO III/IV (%)	OR	95%CI	p
CC	0 (0,0%)	0 (0,0%)	–	–	–
CT	89 (87,3%)	18 (85,7%)	0,876	0,226 – 3,393	0,849
TT	13 (12,7%)	3 (14,3%)	1,141	0,295 – 4,418	0,849
C	89 (43,6%)	18 (83,3%)	0,876	0,226 – 3,393	0,849
T	115 (56,4%)	7 (16,7%)	1,141	0,295 – 4,418	0,849
GENOTYP/ ALLEL	STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI		OR	95%CI	p
	G1/2 (%)	G3 (%)			
CC	0 (0,0%)	0 (0,0%)	–	–	–
CT	96 (87,3%)	11 (84,6%)	0,802	0,161 – 4,003	0,788
TT	14 (12,7%)	2 (15,4%)	1,247	0,250 – 6,222	0,788
C	96 (43,6%)	11 (42,3%)	0,802	0,161 – 4,003	0,788
T	124 (56,4%)	15 (57,7%)	1,247	0,250 – 6,222	0,788
GENOTYP/ ALLEL	NACIEKANIE MIĘŚNIÓWKI TRZONU MACICY		OR	95%CI	p
	< 1/2 (%)	> 1/2 (%)			
CC	0 (0,0%)	0 (0,0%)	–	–	–
CT	56 (86,2%)	51 (87,9%)	1,171	0,406 – 3,373	0,77
TT	9 (13,8%)	7 (12,1%)	0,854	0,296 – 2,460	0,77
C	56 (43,1%)	51 (44,0%)	1,171	0,406 – 3,373	0,77
T	74 (56,9%)	65 (56,0%)	0,854	0,296 – 2,460	0,77
GENOTYP/ ALLEL	ZAJĘCIE POWIERZCHNI NACZYNIOWYCH		OR	95%CI	p
	NIE (%)	TAK (%)			
CC	0 (0,0%)	0 (0,0%)	–	–	–
CT	54 (85,7%)	16 (88,9%)	1,231	0,255 – 5,939	0,796
TT	9 (14,3%)	2 (11,1%)	0,813	0,168 – 3,921	0,796
C	54 (42,9%)	16 (44,4%)	0,231	0,255 – 5,939	0,796
T	72 (57,1%)	20 (55,6%)	0,813	0,168 – 3,921	0,796
GENOTYP/ ALLEL	WIEK PACJENTEK		OR	95%CI	p
	< 60 (%)	≥ 60 (%)			
CC	0 (0,0%)	0 (0,0%)	–	–	–
CT	48 (88,9%)	59 (85,5%)	0,738	0,250 – 2,175	0,581
TT	6 (11,1%)	10 (14,5%)	1,356	0,460 – 3,999	0,581
C	48 (44,4%)	59 (42,8%)	0,738	0,250 – 2,175	0,581
T	60 (55,6%)	79 (57,2%)	1,356	0,460 – 3,999	0,581

Analiza miejsca polimorficznego *rs1805113*

Rycina 5.26. przedstawia rozkład fluorescencji zaobserwowany w trakcie genotypowania miejsca polimorficznego *rs1805113* (p.Phe675=). W **tabeli 5.15.** zestawiono rozkład częstości jego genotypów oraz alleli, jak również wyniki przeprowadzonej analizy ilorazu szans (OR).



Rycina 5.26. Genotypowanie miejsca polimorficznego *rs1805113* genu *TGFB3*.

Tabela 5.15. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs1805113* genu *TGFB3* w raku endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	RAK ENDOMETRIUM n=123 (%)	KONTROLA n=248 (%)	OR	95%CI	p	HWE ^a
TT	46 (37,4%)	87 (35,1%)	1,106	0,706 – 1,732	0,661	
TC	53 (43,1%)	123 (49,6%)	0,769	0,498 – 1,189	0,238	0,612
CC	24 (19,5%)	38 (15,3%)	1,340	0,762 – 2,355	0,310	
TC+CC ^b			0,905	0,578 – 1,417	0,663	
TC+TT ^c			0,746	0,425 – 1,312	0,308	
T	145 (58,9%)	297 (59,9%)	0,962	0,707 – 1,311	0,808	
C	101 (41,1%)	199 (40,1%)	1,039	0,763 – 1,415	0,808	

^azgodność w rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^bmodel dominujący; ^cmodel recesywny

Analiza statystyczna wykazała brak zwiększonego ryzyka zachorowania na raka endometrium w przypadku któregośkolwiek z wariantów genotypowych, jak również wariantów allelicznych miejsca polimorficznego *rs1805113* (**Tab. 5.15.**). Ocena związku pomiędzy częstością występowania polimorfizmu *rs1805113* a parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału wykazała brak istotnych statystycznie różnic w częstości występowania wariantów polimorficznych w odniesieniu do parametrów kliniczno-patologicznymi, tj. stadium zaawansowania raka ocenianego w skali FIGO, stopnia złośliwości komórek nowotworowych, naciekania mięśniówki trzonu macicy, czy zajęcia

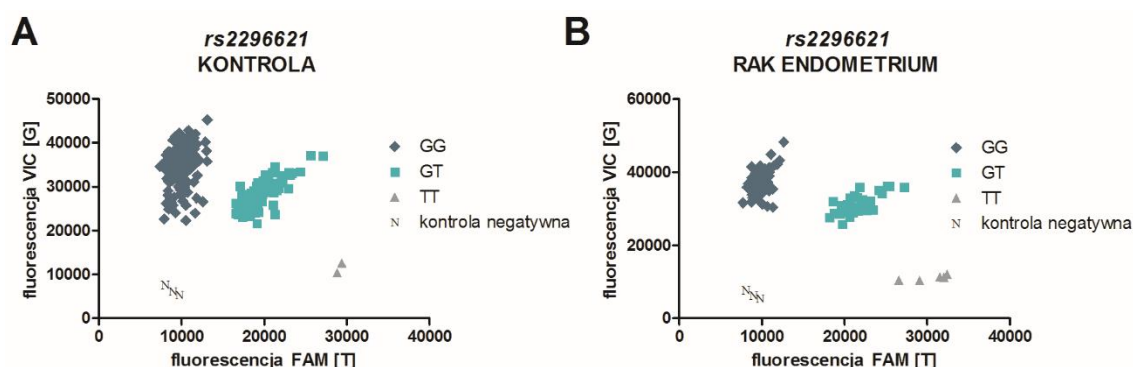
powierzchni naczyńiowych, a także wieku pacjentek w chwili diagnozy (Tab. 5.16.).

Tabela 5.16. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs1805113* genu *TGFB3* z uwzględnieniem parametrów kliniczno-patologicznych raka endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	FIGO I/II (%)	FIGO III/IV (%)	OR	95%CI	p
TT	36 (35,3%)	10 (47,6%)	0,667	0,646 – 4,300	0,291
TC	45 (44,1%)	8 (38,1%)	0,779	0,297 – 2,043	0,612
CC	21 (20,6%)	3 (14,3%)	0,643	0,173 – 2,390	0,510
T	117 (57,4%)	35 (83,3%)	1,433	0,734 – 2,798	0,292
C	87 (42,6%)	7 (16,7%)	0,698	0,357 – 1,362	0,292
GENOTYP/ ALLEL	STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI		OR	95%CI	p
	G1/2 (%)	G3 (%)			
TT	42 (38,2%)	4 (30,8%)	0,720	0,208 – 2,484	0,603
TC	47 (42,7%)	6 (46,2%)	1,149	0,362 – 3,643	0,814
CC	21 (19,1%)	3 (23,1%)	1,271	0,321 – 5,029	0,732
T	131 (59,5%)	14 (53,8%)	0,811	0,373 – 1,762	0,597
C	89 (40,5%)	12 (46,2%)	1,233	0,568 – 2,678	0,597
GENOTYP/ ALLEL	NACIEKANIE MIĘŚNIÓWKI TRZONU MACICY		OR	95%CI	p
	< 1/2 (%)	> 1/2 (%)			
TT	27 (41,5%)	19 (32,8%)	0,686	0,328 – 1,434	0,316
TC	26 (40,0%)	27 (46,6%)	1,306	0,639 – 2,673	0,464
CC	12 (18,5%)	12 (20,7%)	1,152	0,472 – 2,812	0,756
T	80 (61,5%)	65 (56,0%)	1,136	0,581 – 2,222	0,407
C	50 (38,5%)	51 (44,0%)	1,228	0,756 – 1,995	0,407
GENOTYP/ ALLEL	ZAJĘCIE POWIERZCHNI NACZYŃIOWYCH		OR	95%CI	p
	NIE (%)	TAK (%)			
TT	22 (34,9%)	7 (38,9%)	1,077	0,386 – 3,007	0,888
TC	27 (42,9%)	6 (33,3%)	0,617	0,215 – 1,768	0,369
CC	14 (22,2%)	5 (27,8%)	1,741	0,554 – 5,470	0,343
T	71 (56,3%)	20 (55,6%)	0,864	0,439 – 1,700	0,672
C	55 (43,7%)	16 (44,4%)	1,158	0,588 – 2,278	0,672
GENOTYP/ ALLEL	WIEK PACJENTEK		OR	95%CI	p
	< 60 (%)	≥ 60 (%)			
TT	18 (33,3%)	28 (40,6%)	1,366	0,650 – 2,869	0,410
TC	26 (48,1%)	27 (39,1%)	0,692	0,337 – 1,423	0,317
CC	10 (18,5%)	14 (20,3%)	1,120	0,454 – 2,763	0,806
T	62 (57,4%)	83 (60,1%)	1,107	0,681 – 1,800	0,681
C	46 (42,6%)	55 (39,9%)	0,903	0,556 – 1,468	0,681

Analiza miejsca polimorficznego rs2296621

Rycina 5.27. przedstawia rozkład fluorescencji zaobserwowany w trakcie genotypowania miejsca polimorficznego rs2296621 (c.2285-99G>T). W **tabeli 5.17.** zestawiono rozkład częstości jego genotypów oraz alleli, jak również wyniki przeprowadzonej analizy ilorazu szans (OR).



Rycina 5.27. Genotypowanie miejsca polimorficznego rs2296621 genu *TGFB3*.

Tabela 5.17. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego rs2296621 genu *TGFB3* w raku endometriumu.

GENOTYP/ ALLEL	RAK ENDOMETRIUM n=123 (%)	KONTROLA n=248 (%)	OR	95%CI	p	HWE ^a
GG	82 (66,7%)	178 (71,8%)	0,787	0,494 – 1,253	0,312	0,126
GT	36 (29,3%)	68 (27,4%)	1,095	0,679 – 1,767	0,709	
↑ TT	5 (4,1%)	2 (0,8%)	5,212	1,000 – 27,259	0,050	
GT+TT ^b			1,271	0,798 – 2,026	0,313	0,134
↓ GT+GG ^c			0,192	0,037 – 1,003	0,043	
G	200 (81,3%)	424 (85,5%)	0,726	0,478 – 1,104	0,134	
T	46 (18,7%)	72 (14,5%)	1,377	0,906 – 2,094	0,134	

^azgodność w rozkładem Hardy'ego-Weinberga; ^bmodel dominujący; ^cmodel recesywny

Analiza statystyczna wykazała zwiększone ryzyko zachorowania na raka endometrium w przypadku genotypu TT (OR – 5,212; 95%CI 1,000 – 27,259; $p=0,050$) (**Tab. 5.17.**). Ponadto zaobserwowano, że genotyp GT w sposób istotny zwiększa ryzyko występowania bardziej agresywnych postaci raka endometrium o stopniu złośliwości G3 (OR – 3,259; 95%CI 1,011 – 10,499; $p=0,048$), natomiast wariant GG jest charakterystyczny dla mniej agresywnych postaci raka endometrium (OR – 0,268; 95%CI 0,0815 – 0,880; $p=0,03$). Jednocześnie w przypadku wariantów allelicznych stwierdzono, że allel T sprzyja zwiększonej (OR – 2,566; 95%CI 1,05 – 6,272; $p=0,039$), podczas gdy allel G zmniejszonej

złośliwości raka endometrium (OR – 0,390; 95%CI 0,159 – 0,953; $p=0,039$) (Tab. 5.18.). W przypadku pozostałych parametrów kliniczno-patologicznych, tj. stadium zaawansowania raka ocenianego w skali FIGO, naciekania mięśniówki trzonu macicy, czy zajęcia powierzchni naczyniowych, a także wieku pacjentek w chwili diagnozy nie stwierdzono występowania zwiększonego ryzyka w związku z występowaniem jakiegokolwiek wariantu polimorficznego *rs2296621* (Tab. 5.18.).

Tabela 5.18. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs2296621* genu *TGFB3* z uwzględnieniem parametrów kliniczno-patologicznych raka endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	FIGO I/II (%)	FIGO III/IV (%)	OR	95%CI	<i>p</i>
GG	67 (65,7%)	15 (71,4%)	1,306	0,466 – 3,663	0,612
GT	31 (30,4%)	5 (23,8%)	0,716	0,241 – 2,127	0,547
TT	4 (3,9%)	1 (4,8%)	1,225	0,130 – 11,547	0,859
G	165 (80,9%)	35 (83,3%)	1,175	0,493 – 2,802	0,716
T	39 (19,1%)	7 (16,7%)	0,851	0,357 – 2,029	0,716
GENOTYP/ ALLEL	STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI		OR	95%CI	<i>p</i>
	G1/2 (%)	G3 (%)			
↓ GG	77 (70,0%)	5 (38,5%)	0,268	0,0815 – 0,880	0,03
↑ GT	29 (26,4%)	7 (53,8%)	3,259	1,011 – 10,499	0,048
TT	4 (3,6%)	1 (7,7%)	2,208	0,228 – 21,400	0,494
↓ G	183 (83,2%)	17 (65,4%)	0,390	0,159 – 0,953	0,039
↑ T	37 (16,8%)	9 (34,6%)	2,566	1,05 – 6,272	0,039
GENOTYP/ ALLEL	NACIEKANIE MIĘŚNIÓWKI TRZONU MACICY		OR	95%CI	<i>p</i>
	< 1/2 (%)	> 1/2 (%)			
GG	44 (67,7%)	38 (65,5%)	0,907	0,428 – 1,921	0,798
GT	19 (29,2%)	17 (29,3%)	1,004	0,461 – 2,186	0,992
TT	2 (3,1%)	3 (5,2%)	1,718	0,277 – 10,662	0,561
G	107 (82,3%)	93 (80,2%)	0,873	0,465 – 1,641	0,674
T	23 (17,7%)	23 (19,8%)	1,145	0,610 – 2,150	0,674
GENOTYP/ ALLEL	ZAJĘCIE POWIERZCHNI NACZYNIOWYCH		OR	95%CI	<i>p</i>
	NIE (%)	TAK (%)			
GG	40 (63,5%)	12 (66,7%)	1	0,346 – 2,888	1,000
GT	21 (33,3%)	5 (27,8%)	0,918	0,302 – 2,795	0,880
TT	2 (3,2%)	1 (5,6%)	1,485	0,156 – 14,102	0,730
G	101 (80,2%)	29 (80,6%)	0,947	0,393 – 2,281	0,903
T	25 (19,8%)	7 (19,4%)	1,056	0,438 – 2,544	0,903

Tabela 5.18. cd. Rozkład częstości genotypów i alleli wraz z analizą OR miejsca polimorficznego *rs2296621* genu *TGFB3* z uwzględnieniem parametrów kliniczno-patologicznych raka endometrium.

GENOTYP/ ALLEL	WIEK PACJENTEK		OR	95%CI	<i>p</i>
	< 60 (%)	≥ 60 (%)			
GG	35 (64,8%)	47 (68,1%)	1,160	0,546 – 2,465	0,700
GT	19 (35,2%)	17 (24,6%)	0,602	0,275 – 1,317	0,204
TT	0 (0,0%)	5 (7,2%)	–	–	–
G	89 (82,4%)	111 (80,4%)	0,882	0,466 – 1,670	0,699
T	19 (17,6%)	27 (19,6%)	1,134	0,599 – 2,148	0,699

5.8.3. Analiza rozkładu kombinacji genotypów miejsc polimorficznych genu *TGFBR3*

Analizą objęto kombinacje genotypów trzech miejsc polimorficznych *rs12566180*, *rs6680463*, *rs2296621* genu *TGFBR3*, tj. tych, dla których wcześniejsze analizy rozkładu alleli lub genotypów wykazały istotne statystycznie różnice w częstościach występowania między grupą badaną a grupą kontrolną (Tab. 5.19.).

Tabela 5.19. Rozkład częstości genotypów miejsc polimorficznych *rs12566180*, *rs6680463*, *rs2296621* genu *TGFBR3* w raku endometrium.

GENOTYP	RAK ENDOMETRIUM n=123 (%)	KONTROLA n=248 (%)	OR	95%CI	p
CC/CC/GG	13 (10,6%)	0 (0,0%)	–	–	–
CC/CC/GT	9 (7,3%)	0 (0,0%)	–	–	–
CC/CC/TT	1 (0,8%)	0 (0,0%)	–	–	–
CC/GC/GG	1 (0,8%)	0 (0,0%)	–	–	–
CC/GG/GG	0 (0,0%)	58 (23,4%)	–	–	–
CC/GG/GT	0 (0,0%)	10 (4,0%)	–	–	–
CT/CC/GG	0 (0,0%)	3 (1,2%)	–	–	–
CT/CC/GT	0 (0,0%)	1 (0,4%)	–	–	–
↑ CT/GC/GG	54 (43,9%)	76 (30,6%)	1,771	1,133 – 2,769	0,012
CT/GC/GT	13 (10,6%)	28 (11,3%)	0,929	0,463 – 1,863	0,835
CT/GC/TT	2 (1,6%)	1 (0,4%)	4,083	0,367 – 45,469	0,253
TT/CC/GG	0 (0,0%)	36 (14,5%)	–	–	–
TT/CC/GT	0 (0,0%)	27 (10,9%)	–	–	–
TT/CC/TT	0 (0,0%)	1 (0,4%)	–	–	–
TT/GC/GG	0 (0,0%)	5 (2,0%)	–	–	–
TT/GC/GT	1 (0,8%)	2 (0,8%)	1,008	0,091 – 11,228	0,995
TT/GG/GG	14 (11,4%)	0 (0,0%)	–	–	–
TT/GG/GT	13 (10,6%)	0 (0,0%)	–	–	–
TT/GG/TT	2 (1,6%)	0 (0,0%)	–	–	–

Przeprowadzona analiza OR wykazała, że obecność kombinacji genotypu CT/GC/GC miejsc polimorficznych *rs12566180*, *rs6680463*, *rs2296621* genu *TGFBR3* w sposób istotny statystycznie zwiększa ryzyko zachorowania na raka endometrium (OR – 1,771; 95%CI 1,133 – 2,769; $p=0,012$) (Tab. 5.19.).

5.8.4. Analiza rozkładu kombinacji haplotypów miejsc polimorficznych genu *TGFBR3*

Analizą objęto kombinacje haplotypów trzech miejsc polimorficznych *rs12566180*, *rs6680463*, *rs2296621* genu *TGFBR3*, tj. tych, dla których wcześniejsze analizy rozkładu alleli lub genotypów wykazały istotne statystycznie różnice w częstościach występowania między grupą badaną a grupą kontrolną (Tab. 5.20.).

Tabela 5.20. Rozkład częstości haplotypów miejsc polimorficznych *rs12566180*, *rs6680463*, *rs2296621* genu *TGFBR3* w raku endometrium.

HAPLOTYP	RAK ENDOMETRIUM n=984 (%)	KONTROLA n=1984 (%)	OR	95%CI	p
↓ CGG	125 (12,7%)	684 (34,5%)	0,694	0,604 – 0,798	<0,001
CGT	17 (1,7%)	70 (3,5%)	0,703	0,472 – 1,047	0,083
↑ CCG	265 (26,9%)	194 (9,8%)	1,856	1,520 – 2,267	<0,001
↑ CCT	61 (6,2%)	32 (1,6%)	1,874	1,315 – 2,670	<0,001
↑ TGG	287 (29,2%)	204 (10,3%)	1,917	1,572 – 2,338	<0,001
↑ TGT	87 (8,8%)	34 (1,7%)	2,038	1,466 – 2,835	<0,001
↓ TCG	123 (12,5%)	614 (30,9%)	0,648	0,550 – 0,762	<0,001
↓ TCT	19 (1,9%)	152 (7,7%)	0,569	0,404 – 0,802	0,001

Przeprowadzona analiza OR wykazała, że obecność czterech kombinacji haplotypów miejsc polimorficznych *rs12566180*, *rs6680463*, *rs2296621* genu *TGFBR3* w sposób istotny statystycznie zwiększają ryzyko zachorowania na raka endometrium, są to odpowiednio haplotypy CCG (OR – 1,856; 95%CI 1,520 – 2,267; $p<0,001$), CCT (OR – 1,874; 95%CI 1,315 – 2,670; $p<0,001$), TGG (OR – 1,917; 95%CI 1,572 – 2,338; $p<0,001$) oraz TGT (OR – 2,038; 95%CI 1,466 – 2,835; $p<0,001$) (Tab. 5.20.).

5.8.5. Analiza rozkładu częstości alleli badanych miejsc polimorficznych genu *TGFB3* w grupie kontrolnej w porównaniu z populacją europejską

Przeprowadzona analiza porównawcza rozkładu częstości badanych alleli w grupie kontrolnej z danymi zamieszczonymi w bazie HapMap (<https://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>; HapMap Data Rel #28 Phase II+III, august10, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126) dla populacji północno- i zachodnioeuropejskiej (CEU) nie wykazała statystycznie istotnych różnic w przypadku miejsca polimorficznego *rs12566180* dla którego zaobserwowano różnice w częstościach występowania genotypów lub alleli między grupą kontrolną, a grupą badaną oraz miejsc *rs883873*, *rs2770186*, *rs1805113*, dla których nie wykazano różnic. Stwierdzono natomiast istotne statystycznie różnice w przypadku miejsc polimorficznych *rs1805110* ($p<0,001$) oraz *rs2296621* ($p=0,035$). W przypadku dwóch badanych miejsc polimorficznych, tj. *rs12141128* oraz *rs6680463* brak jest dostępnych danych dotyczących częstości występowania ich alleli w porównywanej z grupą kontrolną populacją CEU (Tab. 5.21.).

Tabela 5.21. Porównanie rozkładu częstości alleli badanych miejsc polimorficznych genu *TGFB3* w grupie kontrolnej oraz populacji północno- i zachodnioeuropejskiej (CEU) na podstawie danych pochodzących z bazy HapMap. bd. – brak danych

SNP	ALLEL	CZĘSTOŚĆ ALLELI W GRUPIE KONTROLNEJ (%)	CZĘSTOŚĆ ALLELI W BAZIE HapMap (%)	<i>p</i>
<i>rs883873</i>	A	90,1%	91,6%	0,647
	G	9,9%	8,4%	
<i>rs2770186</i>	T	42,7%	38,9%	0,335
	C	57,3%	61,1%	
<i>rs12141128</i>	A	43,5%	bd.	
	G	56,5%		
<i>rs12566180</i>	C	49,4%	47,35%	0,610
	T	50,6%	52,65%	
<i>rs6680463</i>	G	50,0%	bd.	
	C	50,0%		
<i>rs1805110</i>	C	42,7%	94,7%	<0,0001
	T	57,3%	5,3%	
<i>rs1805113</i>	T	59,9%	55,3%	0,249
	C	40,1%	44,7%	
<i>rs2296621</i>	G	85,5%	79,2%	0,035
	T	14,5%	20,8%	

6. Dyskusja

Nowotwory endometrium stanowią jedną z najczęściej diagnozowanych chorób rozrostowych wśród kobiet. Zgodnie z ostatnimi danymi statystycznymi w ciągu najbliższej dekady można spodziewać się wzrostu liczby nowych przypadków zachorowania na ten typ nowotworu zwłaszcza u kobiet w średnim i podeszłym wieku (Didkowska i wsp., 2009). Obserwowanej tendencji wzrostowej sprzyjają nie tylko udoskonalone techniki obrazowania służące wczesnemu wykrywaniu choroby nowotworowej trzonu macicy, ale przede wszystkim postępujące starzenie się populacji polskiej. W przeciwieństwie do innych chorób nowotworowych, w przypadku nowotworów endometrium współczesna medycyna nie dysponuje dobrze zdefiniowanymi markerami biochemicznymi lub molekularnymi umożliwiającymi określenie ryzyka zachorowania, jak również służącymi wczesnej diagnostyce oraz skutecznemu monitorowaniu przebiegu leczenia.

Markerem aktualnie mającym największe znaczenie w ocenie stopnia zaawansowania klinicznego raka endometrium, a pierwotnie opisanym dla nowotworu jajnika, jest antygen nowotworowy CA125 (*ang. carcinoma antigen 125*). Jest to glikoproteina należąca do rodziny mucyn, kodowana przez gen *MUC16* zlokalizowany na chromosomie 19 (Scholler i Urban, 2007). Stężenie antygenu CA125 w surowicy krwi pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem endometrium koreluje ze stadium zaawansowania klinicznego raka, stopniem złośliwości komórek nowotworowych, głębokością naciekania mięśniówki trzonu macicy oraz obecnością przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych (Antonsen i wsp., 2013; Chung i wsp., 2006; Denschlag i wsp., 2007; Nicklin i wsp., 2012; Powell i wsp., 2005; Sood i wsp., 1997). Marker ten ponadto służy jako czynnik pozwalający na monitorowanie przebiegu leczenia, wzrost jego poziomu może świadczyć o wznowie procesu nowotworowego, pomimo braku objawów klinicznych (Lo i wsp., 1999). Niemniej jednak marker CA125 cechuje niska specyficzność, a jego podwyższony poziom w surowicy krwi może towarzyszyć również innym typom nowotworów, tj. nowotworom jajnika, piersi, macicy, płuc, trzustki oraz jelita grubego, jak również być następstwem chorób zapalnych, bądź autoimmunologicznych. Okresowe zmiany poziomu antygenu CA125 mogą być

także następstwem endometriozy lub być związane w sposób fizjologiczny z menstruacją (Badowska-Kozakiewicz, 2012). Ponadto słabą stroną markera CA125 jest jego ograniczona czułość w przypadku raka endometrium o niskim stopniu zaawansowania (Kamińska i Kowalska, 2011).

Poza opisanym antygenem nowotworowym CA125 jako marker raka endometrium typowano m.in. antygen CA19-9 (*ang. cancer antigen 19-9*), antygen CA15-3 (*ang. cancer antigen 15-3*), HE4 (*ang. human epididymis protein 4*) oraz czynnik VEGF (*ang. vascular endothelial growth factor*) związany bezpośrednio z unaczynieniem guza. Czułość w przypadku dwóch pierwszych markerów okazuje się być znacznie poniżej czułości antygenu CA125. Natomiast w przypadku dwóch pozostałych uzyskane wyniki wskazują na ich potencjalne, choć nie pozbawione wad, zastosowanie jako znaczników diagnostyczno-prognostycznych bardziej zaawansowanych stadiów raka endometrium (Antonsen i wsp., 2013; Brennan i wsp., 2014; Dobrzycka i wsp., 2013; Kamat i wsp., 2007; Ma i wsp., 2015; Mutz-Dehbalae i wsp., 2012; Saarelainen i wsp., 2014; Zanotti i wsp., 2012). W związku z powyższym w dalszym ciągu istnieje konieczność prowadzenia badań mających na celu poznanie molekularnych mechanizmów transformacji nowotworowej endometrium i w konsekwencji pozwalających na identyfikację potencjalnych markerów służących diagnostyce, bądź monitorowaniu przebiegu leczenia pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem endometrium.

Na podstawie aktualnej wiedzy rozwój i progresja raka endometrium może wiązać się z różnymi zaburzeniami molekularnymi, odpowiedzialnymi za nieprawidłową sygnalizację komórkową. Rodzaj i charakter zmian molekularnych uzależniony jest w dużym stopniu od typu klinicznego raka. W typie I, tj. raku endometrioidalnym obserwuje się zmienioną ekspresję supresorów, tj. białek PTEN, p53, p21^{Cip1}, p16^{Ink4a}, p27^{Kip1}; jak również nieprawidłową ekspresję białek onkogennych w tym β -kateniny, Her2/Neu, a także innych jak receptory dla progesteronu i estrogenów, także GPER, oraz białek hMLH1, hMSH2, CD105, MMP-2,7,9, Ki-67, GLUT1,8, czy survivina. Ponadto identyfikuje się mutacje, utratę heterozygotyczności, bądź hipermetylację w genach *PTEN*, *TP53*, *BRAF*, *CTNNB1* oraz *KRAS*. Typ II raka endometrium, tj. rak nieendometrioidalny charakteryzuje się mutacjami genów i w konsekwencji

nieprawidłową ekspresją białek Her2/Neu, p53 oraz E-kadheryny (Klemba i wsp., 2008; Matias-Guiu i Davidson, 2014; Werner i Salvesen, 2014). Stwierdza się także występowanie zwiększonego ryzyka zachorowania na raka trzonu macicy u kobiet będących nosicielkami mutacji w genie *BRCA1*, szczególnie po ekspozycji na stosowany w terapii raka piersi tamoksyfen (Shai i wsp., 2014). W przypadku raka endometrium typu II rozwój i progresja nowotworowa może wiązać się z aneuploidią komórek nowotworowych. U pacjentek ze stwierdzoną aneuploidią obserwowano krótszy okres remisji oraz niższy odsetek 10-letnich przeżyć (Susini i wsp., 2007; Wik i wsp., 2009).

Niektóre z powyższych zmian molekularnych, ze względu na istnienie korelacji pomiędzy stadiami zaawansowania choroby nowotworowej lub przeżywalnością pacjentek, typowane są jako potencjalne markery nowotworzenia endometrium, których ocena rozszerzałaby wachlarz dostępnych metod diagnostycznych o diagnostykę molekularną. Jednakże niska częstość występowania opisanych powyżej zaburzeń w przypadku raka endometrioidalnego nakłada konieczność dalszego poszukiwania nowych celów molekularnych o uniwersalnym charakterze, mogących sprostać heterogenności komórek nowotworowych obserwowanej w tym typie nowotworu (Werner i Salvesen, 2014).

Dane literaturowe wskazują, że rozwój i progresja raka endometrium może wiązać się z nieprawidłowym funkcjonowaniem sygnalizacji komórkowej indukowanej transformującymi czynnikami wzrostu typu β , podobnie jak ma to miejsce w innych typach nowotworów. Nieprawidłowy poziom ekspresji komponentów szlaku TGF β stwierdza się m.in. w nowotworach piersi, jajnika prostaty, płuc, jelita grubego, trzustki, wątroby, nerki a także w przypadku czerniaka (Neuzillet i wsp., 2015). Jest on następstwem różnorodnych zaburzeń molekularnych mających miejsce na różnych poziomach kaskady sygnalizacyjnej, począwszy od receptorów TGF β typu I oraz typu II, poprzez receptory pomocnicze, na białkach efektorowych Smad kończąc. Do zaburzeń takich zalicza się mutacje, niestabilność mikrosatelitarną (MSI, *ang. microsatellite instability*) oraz utratę heterozygotyczności w genach kodujących kluczowe elementy sygnalizacji TGF β , tj. receptory TGF β R2, TGF β R1 oraz białka Smad (Padua i Massague, 2009).

Niestabilność mikrosatelitarną prowadzącą do inaktywacji ekspresji genu *TGFBR2* stwierdza się w przypadku gruczolakoraków żołądka, jelita grubego, dróg żółciowych oraz płuc. Z kolei utrata heterozygotyczności lub mutacje w dłuższym ramieniu chromosomu 18, skutkujące zahamowaniem ekspresji białka Smad4 obserwowane są w ok. 50% przypadków przewodowego gruczolakoraka trzustki, a także w raku przełyku, jak i w 30% przypadków raka jelita grubego (Fukushima i wsp., 2003; Neuzillet i wsp., 2015; Papageorgis i Stylianopoulos, 2015; Tian i wsp., 2011). W porównaniu do genu *SMAD4*, mutacje w genie *SMAD2* cechuje mniejszy odsetek występowania i wynosi on 11% oraz 7% przypadków odpowiednio raka jelita grubego oraz raka płuc (Fleming i wsp., 2013; Waite i Eng, 2003). Natomiast nie stwierdza się zasadniczo u człowieka występowania mutacji w genie kodującym białko Smad3, jednakże niższy poziom jego ekspresji obserwuje się w 37% przypadków raka żołądka oraz w ostrej białaczce limfoblastycznej wywodzącej się z komórek linii T (Han i wsp., 2004; Wolfram i wsp., 2004). Jedyne dane literaturowe dotyczące znaczenia mutacji genu *SMAD3* w procesie nowotworzenia wskazują na ich niską częstość występowania w raku jelita grubego, wynosząc 4,3%, co sugeruje tym samym istnienie innych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zaburzenie sygnalizacji TGFβ w tym typie nowotworu (Fleming i wsp., 2013). W raku endometrium obserwuje się natomiast zmienioną ekspresję receptorów TGFβ typu I i II na poziomie białka, a w szczególności receptora typu II, dla którego obserwowany wzrost ekspresji korelował z progresją choroby nowotworowej (Mhawech-Fauceglia i wsp., 2011; Parekh i wsp., 2002; Piestrzeniewicz-Ulanska i wsp., 2002).

Dalsze poszukiwania zaburzeń warunkujących nieprawidłową sygnalizację za pośrednictwem szlaku TGFβ, a mogących leżeć u podstaw nowotworzenia rzuciły światło na istotną rolę receptorów TGFβ typu III, przedstawicielem których jest najlepiej poznany pod względem funkcji betaglikan. Badania ekspresji betaglikanu prowadzone w różnych typach nowotworów dowiodły jego potencjalnej roli jako supresora transformacji nowotworowej. Obniżenie poziomu ekspresji betaglikanu jest cechą charakterystyczną nowotworów wywodzących się z różnych narządów, a w szczególności piersi, jajnika, prostaty, trzustki, wątroby, nerek, pęcherza moczowego, płuc a także układu nerwowego. Obserwowane obniżenie ekspresji betaglikanu korelowało wraz z postępem choroby

nowotworowej ulegając pogłębieniu w bardziej zaawansowanych stadiach choroby, tj. wykazujących zdolność do inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych (Bae i wsp., 2009; Bilandzic i wsp., 2009; Copland i wsp., 2003; Dong i wsp., 2007; Finger i wsp., 2008; Gordon i wsp., 2008; Hempel i wsp., 2007; Iolascon i wsp., 2000; Lambert i wsp., 2011; Liu i wsp., 2013b; Sharifi i wsp., 2007; Turley i wsp., 2007). W przeciwieństwie do wymienionych powyżej typów nowotworów, w których stwierdzono obniżoną ekspresję betaglikanu, w raku jelita grubego, pęcherza moczowego oraz przewlekłej białaczce limfocytowej wywodzącej się z komórek linii B obserwuje się wzrost poziomu ekspresji tego proteoglikanu. Jednakże, jak stwierdzono w przypadku raka jelita grubego i pęcherza moczowego zwiększona ekspresja betaglikanu nie dotyczyła wszystkich analizowanych preparatów, a w raku pęcherza moczowego ograniczała się do stadiów naciekających mięśniówkę tego narządu (Gatza i wsp., 2011; Jelinek i wsp., 2003; Liu i wsp., 2013a). Powyższe wyniki sugerują złożoną tkankowo-specyficzną funkcję betaglikanu nie tylko jako supresora nowotworzenia, ale także jako czynnika promującego karcynogenezę.

W niniejszej pracy ocenie poddano ekspresję betaglikanu, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, w grupie pacjentek ze zdiagnozowanym gruczolakorakiem endometrium w odniesieniu do materiału prawidłowego. Analizą objęto wyłącznie homogeną pulę gruczolakoraków endometrium z pominięciem przypadków gruczolakoraków endometrium ze zróżnicowaniem płaskonabłonkowym (*ang. endometrial adenocarcinoma variant with squamous differentiation*) czy cechujących się niską częstością występowania mięsakoraków trzonu macicy (*ang. uterine carcinosarcoma*), choć jak wykazano wcześniej w tych typach histologicznych obserwowano również obniżony poziom ekspresji mRNA betaglikanu (Semczuk i wsp., 2013; Zakrzewski i wsp., 2011).

Analiza ekspresji mRNA genu *TGFBR3* wykazała istotne statystycznie ($p < 0,001$) obniżenie ilości transkryptu w 100% preparatów raka endometrium w porównaniu do materiału prawidłowego. Obserwowany niższy poziom mRNA *TGFBR3* miał miejsce już na wczesnym etapie procesu nowotworowego ocenianym za pomocą skali FIGO (FIGO I), stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych (G1) oraz naciekania mięśniówki trzonu macicy przez komórki nowotworowe

poniżej połowy jej grubości ($<1/2$). Obniżeniu ekspresji mRNA genu *TGFBR3* towarzyszył w 100% przebadanych preparatów raka endometrium w odniesieniu do materiału prawidłowego istotny statystycznie ($p<0,001$ dla materiału nowotworowego i prawidłowego pochodzącego od tej samej pacjentki) spadek ilości betaglikanu na poziomie białka. Obniżenie ekspresji betaglikanu na poziomie białka wydaje się towarzyszyć progresji procesu nowotworowego. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze wyniki Floria i wsp. (2005), którzy wykazali obniżenie ekspresji betaglikanu oraz podjednostki α inhibiny zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w gruczolakorakach endometrium w porównaniu do materiału prawidłowego, ocenianych odpowiednio metodami półilościowej reakcji PCR z odwrotną transkryptazą (RT-PCR, *ang. reverse transcriptase PCR*) oraz immunohistochemicznie. W pracy tej jednakże nie analizowano związku pomiędzy ekspresją betaglikanu a parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału za wyjątkiem stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych uwzględniając dwie podgrupy, tj. nowotwory wysoko i niskozróżnicowane. Zastosowana w celu oceny poziomu białka technika immunohistochemiczna wykazała, że niższy poziom ekspresji betaglikanu ma miejsce na wczesnym etapie procesu nowotworowego i ulega pogłębieniu wraz ze wzrostem złośliwości komórek nowotworowych. Ponadto zaobserwowane w przypadku preparatów nowotworowych silne wybarwienie świadczące o wysokiej ekspresji betaglikanu w śródbłonku naczyniowym, może wskazywać na zaangażowanie betaglikanu w proces unaczynienia rozwijającego się guza. Powyższe wyniki wskazują na istotne znaczenie betaglikanu w odpowiedzi na stymulację czynnikami z nadrodziny TGF β zwłaszcza izoformami TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 oraz aktywinami i inhibinami, które z kolei pełnią kluczową rolę w rozwoju i funkcjonowaniu macicy, a zwłaszcza proliferacji komórek endometrium (Ingman i Robertson, 2002; Li, 2014; Wijayarathna i de Kretser, 2016). Jednoczesne obniżenie ekspresji betaglikanu oraz podjednostki α inhibiny może skutkować promowaniem sygnalizacji pochodzącej od aktywin, tym samym przyczyniając się do rozwoju i progresji raka, choć zasadniczy udział aktywin w kontekście choroby nowotworowej wydaje się ściśle zależeć od stanu fizjologicznego oraz typu tkanki (Loomans i Andl, 2014).

Kluczowych informacji dotyczących roli betaglikanu podczas rozwoju i progresji nowotworów dostarczyły badania prowadzone z zastosowaniem linii ludzkich komórek nowotworowych, a także z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. W badaniach tych stosując różnorodne podejścia metodyczne wykazano, że przywrócenie ekspresji betaglikanu skutkowało zmniejszeniem ruchliwości oraz ograniczeniem inwazyjnego potencjału komórek nowotworowych. W przypadku komórek KGN, COV434 oraz Ovca429 wywodzących się z nowotworów jajnika, jak również w przypadku komórek raka prostaty DU145 oraz raka piersi MDA-MB231 transfekcja wektorami niosącymi sekwencję kodującą betaglikan skutkowała zwiększeniem adhezji komórek do komponentów ECM, tj. fibronektyny, kolagenu typu IV oraz witronektyny, zahamowaniem migracji komórek ocenianym w matryzeli, tj. mieszaninie białek ECM (*ang. matrigel*) lub w teście „gojenia się rany” (*ang. wound healing*) (Bilandzic i wsp., 2009; Dong i wsp., 2007; Hempel i wsp., 2007; Turley i wsp., 2007). Podobne wyniki uzyskano w przypadku komórek A549 i A460 niedrobnokomórkowego raka płuc oraz PANC-1 raka trzustki. Przywrócenie ekspresji betaglikanu zmniejszało ruchliwość tych komórek nowotworowych, co jak zwłaszcza sugerują badania przeprowadzone na linii PANC-1 ma bezpośredni związek z zaangażowaniem szlaku TGFβ w proces przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT, *ang. epithelial-mesenchymal transition*) (Finger i wsp., 2008; Gordon i wsp., 2008). Z kolei badania prowadzone na liniach komórkowych UMRC6 i UMRC3 wywodzących się odpowiednio z komórek nieprzerzutującego oraz przerzutującego raka nerki wykazały, że betaglikan jest niezbędnym komponentem sygnalizacji indukowanej czynnikami TGFβ, regulującym proliferację komórek nowotworowych. Przywrócenie ekspresji betaglikanu w komórkach UMRC3 ograniczało zdolność tych komórek do formowania kolonii (Copland i wsp., 2003). Dodatkowym potwierdzeniem udziału betaglikanu w supresji nowotworowej są wyniki eksperymentów wykorzystujących modele zwierzęce. Komórki nowotworów płuc, prostaty oraz piersi, pierwotnie niewykazujące ekspresji betaglikanu, po iniekcji do organizmu modelowego (*ang. xenograft assay*) wykazywały większy potencjał metastatyczny, niż komórki transfekowane wektorami ekspresyjnymi dla betaglikanu. Podobny efekt obserwowano również w przypadku komórek z wyciszoną interferencyjnym

RNA ekspresją betaglikanu (Criswell i wsp., 2008; Criswell i Arteaga, 2007; Dong i wsp., 2007; Finger i wsp., 2008; Turley i wsp., 2007).

W celu określenia molekularnego podłoża obniżenia ekspresji betaglikanu w raku endometrium dalsze badania objęły analizę metylacji cytozyny w regionie promotorowym genu *TGFBR3*. Metylacja cytozyny jest jedną z wielu modyfikacji epigenetycznych, odpowiedzialnych za wyciszenia ekspresji genów, a jej nasiloną częstość występowania obserwuje się w przypadku różnych typów nowotworów. Na podstawie danych literaturowych oraz analizy bioinformatycznej przeprowadzono ocenę metylacji wyspy CpG zlokalizowanej w pozycji -278/+957 genu kodującego betaglikan. Wytypowana do badania wyspa CpG znajduje się w promotorze proksymalnym genu *TGFBR3*, którego aktywność obserwuje się w większości typów komórek, w przeciwieństwie do promotora dystalnego genu *TGFBR3*, który pozostaje nieaktywny na skutek metylacji jego sekwencji. Wykazano zróżnicowanie osobnicze metylacji pomiędzy pacjentkami ze zdiagnozowanym rakiem endometrium. Spośród przebadanych par preparatów prawidłowych i nowotworowych pochodzących od tych samych pacjentek, 65% (30/46) przypadków nowotworowych cechował istotny statystycznie ($p < 0,001$) wzrost poziomu metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* kodującego betaglikan, podczas gdy w pozostałych 35% (16/46) przypadków stwierdzono istotne statystycznie ($p < 0,001$) obniżenie wartości indeksu metylacji w porównaniu do materiału prawidłowego. Natomiast podobna analiza profilu metylacji przeprowadzona dla nowotworów pęcherza moczowego oraz nerki wykazała brak istotnych statystycznie różnic w poziomach metylacji regionu promotorowego genu *TGFBR3* w preparatach nowotworowych w odniesieniu do materiału prawidłowego. Ponadto, jak dowiedziono w tych dwóch typach nowotworów obniżenie poziomu ekspresji betaglikanu było następstwem metylacji regionu promotorowego genu *GATA3* (Cooper i wsp., 2010; Liu i wsp., 2013b).

Gen *GATA3* liczący sześć eksonów zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 10p15 (<http://www.ensembl.org>, ENSG00000107485). Koduje on białko o aktywności czynnika transkrypcyjnego należące do rodziny GATA (*ang. GATA binding protein*) i pierwotnie zostało zidentyfikowane jako czynnik

transkrypcyjny specyficzny dla limfocytów T (Zheng i Blobel, 2010). W swej strukturze posiada dwa motywy palców cynkowych typu C4 odpowiedzialne za rozpoznawanie sekwencji nukleotydowej 5' (A/T) GATA (A/G) 3'. Podobnie jak wszystkie sześć czynników transkrypcyjnych należących do rodziny GATA, czynnik transkrypcyjny GATA3 reguluje ekspresję wielu genów zaangażowanych m.in. w odróżnicowywanie, proliferację oraz migrację komórek (Asch-Kendrick i Cimino-Mathews, 2016; Du i wsp., 2015). Poza wspomnianym udziałem jako czynnik determinujący różnicowanie komórek układu odpornościowego, a w szczególności limfocytów Th2, czynnik GATA3 odgrywa zasadniczą rolę w rozwoju struktur pochodzenia nabłonkowego w obrębie gruczołu piersiowego, skóry, ucha wewnętrznego, ośrodkowego układu nerwowego, nerek, prostaty i płuc (Chou i wsp., 2010; Tindemans i wsp., 2014; Wan, 2014). Haploinsuficjencja, tj. mutacja jednego z alleli nieprowadząca do całkowitej eliminacji funkcji białka, ale do pewnych efektów jego niedoboru, skutkując niewystarczającym poziomem ekspresji allelu nieuszkodzonego genu *GATA3* związana jest z rozwojem zespołu określanego w literaturze od pierwszych liter objawów jemu towarzyszących skrótem HDR (*ang. hypoparathyroidism, sensorineural deafness and renal disease*), tj. niedoczynności przytarczyc, czuciowo-nerwowej utraty słuchu oraz dysfunkcji nerek (Asch-Kendrick i Cimino-Mathews, 2016). W przypadku prawidłowego endometrium, jak wykazały badania Inmana i wsp. (2008) ekspresja czynnika transkrypcyjnego GATA3 oceniana na poziomie molekularnym podlega cyklicznym wahaniom związanym z fazą cyklu menstruacyjnego, a najwyższy poziom jego ekspresji obserwuje się w późnej fazie wydzielniczej.

W kontekście chorób nowotworowych znaczenie czynnika GATA3 szczególnie uwidacznia się w procesie transformacji nowotworowej gruczołu piersiowego, który podobnie jak rak endometrium wywodzi się z tkanki hormonozależnej. Jak zaobserwowano w badaniach *in vivo* czynnik transkrypcyjny GATA3 modulując ekspresję genów docelowych ogranicza przejście nabłonkowo-mezenchymalne, hamuje różnicowanie komórek nabłonka luminalnego, a także zmniejsza potencjał metastatyczny komórek nowotworowych. Natomiast jak wykazano *ex vivo* obniżony poziom ekspresji czynnika GATA3 silnie korelował ze stadiem zaawansowania choroby nowotworowej, niskim stopniem zróżnicowania komórek nowotworowych, obecnością przerzutów do węzłów

chłonnych oraz negatywnym statusem receptorów ERs (*ang. estrogen receptors*) i PR (*ang. progesterone receptor*), tj. z parametrami jednoznacznie związanymi z gorszym rokowaniem (Du i wsp., 2015, Takaku i wsp., 2015).

Jak wspomniano aktywność czynnika transkrypcyjnego GATA3 odpowiada za regulację ekspresji genów silnie związanych z hamowaniem różnicowania komórek ograniczając tym samym ich inwazyjność oraz zdolność do migracji. Wśród modulowanych genów docelowych czynnika GATA3 znajduje się gen *TGFBR3* kodujący betaglikan, co wykazała praca Coopera i wsp. (2010). Sekwencja nukleotydowa rozpoznawana przez czynnik GATA3 zlokalizowana jest w regionie -559/-534 promotora proksymalnego genu *TGFBR3*.

Następnym więc krokiem podjętym zgodnie z celem niniejszej pracy była ocena poziomu ekspresji genu *GATA3* w raku endometrium w odniesieniu do materiału prawidłowego. Analiza ta wykazała występowanie zróżnicowania osobniczego pomiędzy pacjentkami ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową. Spośród przebadanych przypadków, w 61% (22/36) z nich zaobserwowano istotne statystycznie ($p < 0,01$) obniżenie poziomu transkryptu genu *GATA3*, podczas gdy pozostałe 39% (14/36) cechował istotny statystycznie ($p < 0,05$) wzrost jego poziomu. Szczegółowa ocena występowania związku pomiędzy ekspresją genu *GATA3* a parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału wykazała, że w przypadku preparatów z obniżonym poziomem genu *GATA3* obserwowany spadek wydaje się mieć związek z bardziej zaawansowanymi stadiami procesu nowotworowego, tj. stopniem zróżnicowania komórek nowotworowych G2 i G3, oraz naciekaniem mięśniówki trzonu macicy powyżej połowy jej grubości. Jednocześnie zanotowany spadek ekspresji dotyczył głównie pacjentek poniżej 60 roku życia w chwili diagnozy. Natomiast w grupie preparatów wykazujących wzrost ekspresji mRNA genu *GATA3* istotne statystycznie różnice zanotowano dla nowotworów w stadium zaawansowania FIGO II, stopnia złośliwości histologicznej komórek nowotworowych G1 i G2 oraz braku zajęcia powierzchni naczyń przez rozwijający się guz. Powyższe zmiany nie miały związku z wiekiem pacjentek w chwili diagnozy. Wyniki te mogą wskazywać, że zachowanie czy wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego GATA3 sprzyja mniej zaawansowanym stadiom raka endometrium, tym samym dając

lepsze rokowania dla pacjentek. Prezentowane wyniki dotyczące ekspresji mRNA genu *GATA3* poszerzają wyniki zaprezentowane w dwóch pracach Clark i wsp. (2014) oraz Engelsen i wsp. (2008), w których oceniano immunohistochemicznie ekspresję białka GATA3. W obu pracach pozytywne wybarwienie preparatów wskazujące na ekspresję czynnika GATA3 stwierdzono odpowiednio w 8% (3/39) oraz 19% (40/209) przypadków raka endometrioidalnego. Przy czym tylko w pracy Engelsen i wsp. (2008) przeprowadzona analiza uwzględniała korelację z parametrami kliniczno-patologicznymi analizowanego materiału, w tym m.in. statusem receptorów dla ERs i PR oraz przeżywalnością, a preparaty referencyjne stanowiły zmiany łagodne endometrium. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że ekspresja GATA3 przy jednoczesnym negatywnym statusie receptora $ER\alpha$, wiąże się wyższym stadium zaawansowania nowotworu ocenianym w skali FIGO, większą złośliwością komórek nowotworowych, nasiloną proliferacją potwierdzoną ekspresją markera Ki-67, zajęciem powierzchni naczyń, wysokim indeksem mitotycznym, nieprawidłową ekspresją białek p53 i p16, jak również skróceniem wieku przeżywalności pacjentek (Engelsen i wsp., 2008).

W celu ustalenia molekularnego mechanizmu zaburzenia ekspresji betaglikanu w raku endometrium oceniono również potencjalne znaczenie metylacji w regionie promotorowym genu *GATA3*. Analiza metylacji wykazała występowanie, podobnie jak w przypadku genu *TGFBR3*, zróżnicowania osobniczego pomiędzy pacjentkami z rakiem endometrium. W 67% (32/48) par preparatów raka endometrium, w których zaobserwowano obniżenie transkryptu genu *GATA3*, stwierdzono istotny statystycznie ($p < 0,001$) wzrost poziomu metylacji w regionie promotorowym, podczas gdy pozostałe 33% (16/48) przypadków, charakteryzujące się wzrostem transkryptu genu *GATA3*, cechowało obniżenie ($p < 0,001$) obniżenie poziomu metylacji w regionie promotorowym. O ile uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z danymi dotyczącymi nowotworów nerki oraz pęcherza moczowego opublikowanymi przez Coopera i wsp. (2010) oraz Liu i wsp. (2013b), i wskazującymi, że metylacja regionu promotorowego genu *GATA3* stanowi mechanizm regulujący ekspresję betaglikanu, o tyle, jak wykazano w prezentowanej pracy, zmienny poziom metylacji genu *GATA3* w raku endometrium ma charakter osobniczy.

W celu potwierdzenia regulacji na poziomie transkrypcyjnym ekspresji betaglikanu przez czynnik GATA3 oraz określenia wpływu metylacji w regionach promotorowych genów *TGFBR3* i *GATA3* na poziom ich ekspresji przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy poziomami ich ekspresji, a profilami metylacyjnymi w raku endometrium w porównaniu do materiału prawidłowego. Jak dowiedziono zarówno ekspresja betaglikanu, jak i czynnika transkrypcyjnego GATA3 podlega epigenetycznej regulacji, jednakże tylko w przypadku materiału prawidłowego. Brak powyższej korelacji w raku endometrium sugeruje zaangażowanie dodatkowych mechanizmów mogących zaburzać ekspresję badanych genów. Natomiast w obu rodzajach materiału, tj. prawidłowym oraz nowotworowym potwierdzono istnienie zależności pomiędzy ekspresją betaglikanu a poziomem czynnika transkrypcyjnego GATA3, co wskazuje na transkrypcyjną regulację ekspresji genu *TGFBR3* przez tenże czynnik. Jednakże jak zaobserwowano w preparatach nowotworowych endometrium siła korelacji okazała się być mniejsza, wskazując na udział innych zaburzeń molekularnych skutkujących obniżoną ekspresją genu kodującego betaglikan.

Poszukując mechanizmów molekularnych zaburzenia ekspresji betaglikanu w raku endometrium podjęto próbę ustalenia znaczenia utraty heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3* dla obserwowanego spadku poziomu betaglikanu w tym typie nowotworu. Utrata heterozygotyczności jest częstym zaburzeniem molekularnym identyfikowanym w różnych patologiach człowieka, w tym w chorobach nowotworowych. Definiuje się ją jako utratę funkcji jednego z alleli genu, co w przypadku genów supresorowych może razem z innymi zaburzeniami molekularnymi prowadzić do transformacji nowotworowej. Ocenę LOH dokonuje się za pomocą charakterystycznych dla danego *locus* genowego markerów mikrosatelitarnych, na podstawie długości produktów ich amplifikacji. Potwierdzeniem występowania LOH jest całkowity zanik jednego z pary alleli badanego genu, co występuje niezwykle rzadko bądź co najmniej 50% skrócenie jego długości w materiale nowotworowym w porównaniu do materiału prawidłowego (Stembalska-Kozłowska i wsp., 2003). Do oceny LOH w *locus* genu *TGFBR3* wykorzystano trzy markery mikrosatelitarne, tj. D1S188, D1S435 oraz D1S1588, zlokalizowane na chromosomie 1p, który jak zaobserwował Ragnarsson i wsp. (1999), w różnych typach nowotworów jest szczególnie podatny

na występowanie niestabilności allelicznej. Przeprowadzona analiza raka endometrium wykazała występowanie utraty heterozygotyczności w 54% (15/28), 36% (15/28) oraz 35% (7/20) przypadków informatywnych dla analizowanych markerów, tj. D1S188, D1S435 oraz D1S1588. Utratę heterozygotyczności w przynajmniej jednym markerze mikrosatelitarnym stwierdzono w 52% (25/48) przebadanych przypadków, co stanowiło 64% (25/39) przypadków informatywnych raka endometrium sugerując, że utrata heterozygotyczności jest istotnym mechanizmem molekularnym warunkującym obniżoną ekspresję betaglikanu w tym typie nowotworu. Powyższa ocena wykazała również występowanie niestabilności mikrosatelitarnej, jednakże odsetek preparatów, których dotyczył ten rodzaj zaburzenia molekularnego okazał się znikomy. Uzyskane wyniki dotyczące częstości występowania utraty heterozygotyczności w raku endometrium w kontekście parametrów kliniczno-patologicznych badanego materiału sugerują, że mechanizm ten manifestuje się na wczesnym etapie procesu nowotworzenia endometrium i nie predysponuje do zwiększonej złośliwości rozwijającego się guza. Podobny mechanizm odpowiedzialny za obniżenie ekspresji betaglikanu zaobserwowano również w innych typach nowotworów, w tym wywodzących się z tkanek hormonozależnych, tj. raku piersi oraz prostaty, a także niedrobnokomórkowym raku płuc (NSCLC, *ang. non-small cell lung carcinoma*). W przypadku raka piersi utrata heterozygotyczności oceniana za pomocą markerów mikrosatelitarnych D1S1588 oraz D1S188 dotyczyła połowy analizowanych preparatów (13/26), podczas gdy w raku prostaty oraz NSCLC występowała w 37,5% (3/8) oraz 38,5% (5/13) analizowanych próbek odpowiednio w markerach D1S1588, D1S2804, D1S435 oraz D1S1588, D1S188, D1S2804 (Dong i wsp., 2007; Finger i wsp., 2008; Turley i wsp., 2007). Zbliżony odsetek występowania utraty heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3* w nowotworach wywodzących się z tkanek podlegających regulacji estrogenowej u kobiet, tj. raku piersi oraz endometrium sugeruje podobne znaczenie betaglikanu dla mechanizmu nowotworzenia obu typów nowotworów.

W dalszym etapie badań przeprowadzono analizę polimorfizmów jednonukleotydowych (SNP, *ang. single nucleotide polymorphism*) w genie kodującym betaglikan. Badaniami objętych zostało osiem miejsc polimorficznych

zlokalizowanych w regionie regulatorowym (*rs883873*, *rs2770186*, *rs12141128*) oraz kodującym (*rs12566180*, *rs6680463*, *rs1805110*, *rs1805113*, *rs2296621*) genu *TGFBR3*. Spośród ocenianych SNP wykazano, że najsilniejszy wpływ na zwiększone ryzyko występowania raka endometrium mają warianty polimorficzne *rs12566180* (c.-114+2392C>T), *rs6680463* (c.-114+7008C>G) oraz *rs2296621* (c.2285-99G>T) zlokalizowane w intronach genu kodującego betaglikan. Stwierdzono, że polimorfizmy *rs12566180* (c.-114+2392C>T) oraz *rs6680463* (c.-114+7008C>G) występowały częściej jako warianty heterozygotyczne w grupie badanej niż w grupie kontrolnej, odpowiednio w 56,1% vs. 44,0% ($p=0,028$) oraz 57,7% vs. 45,2% ($p=0,023$), w obu przypadkach zwiększając ryzyko wystąpienia raka endometrium o ok. 1,6-razy. Natomiast częściej występujący w grupie badanej (4,1%) względem grupy kontrolnej (0,8%; $p=0,05$) wariant homozygotyczny TT polimorfizmu *rs2296621* (c.2285-99G>T) wiąże się ze zwiększonym aż o ponad 5-razy ryzykiem zachorowania na raka endometrium. Analiza związków pomiędzy częstością występowania powyższych SNP w genie *TGFBR3* a parametrami kliniczno-patologicznymi badanego materiału nowotworowego wskazała, że wariant homozygotyczny GG polimorfizmu *rs6680463* oraz wariant GT, jak i sam allel T polimorfizmu *rs2296621* determinują zwiększoną złośliwość komórek nowotworowych, częściej występując w grupie nowotworów o stopniu zróżnicowania G3 niż G1/2. Odpowiednio w przypadku nowotworów o wyższym stopniu złośliwości istotna statystycznie częstość występowania wariantów polimorficznych porównując do nowotworów o niższym stopniu odróżnicowania komórek, identyfikowana była dla homozygot GG SNP *rs6680463* w 46,2% vs. 20,9% ($p=0,050$), podczas gdy dla SNP *rs2296621* heterozygoty GT obserwowano w 53,8% vs. 26,4% ($p=0,048$) a występowanie pojedynczego allelu T w 34,6% vs. 16,8% ($p=0,039$). Z kolei analiza rozkładu częstości genotypów oraz alleli miejsc polimorficznych zwiększających prawdopodobieństwo zachorowania na raka endometrium, tj. *rs12566180* (c.-114+2392C>T), *rs6680463* (c.-114+7008C>G) oraz *rs2296621* (c.2285-99G>T) wykazała częstsze występowanie kombinacji genotypów CT/GC/GG (43,9% vs. 30,6%; $p=0,012$) oraz kombinacji haplotypów CCG (26,9% vs. 9,8%; $p<0,001$), CCT (6,2% vs. 1,6%; $p<0,001$), TGG (29,2% vs. 10,3%; $p<0,001$) oraz TGT (8,8% vs. 1,7%; $p<0,001$) u pacjentek ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową w odniesieniu do grupy

kontrolnej. Ponadto spośród przebadanych ośmiu polimorfizmów jednonukleotydowych genu kodującego betaglikan, dwa z nich, tj. *rs1805110* oraz *rs2296621* wykazywały odmienny rozkład częstości alleli w grupie kontrolnej w porównaniu z danymi dotyczącymi populacji europejskiej (CEU) zawartymi w bazie danych HapMap. Niestety powyższej analizy nie udało się przeprowadzić w przypadku miejsc polimorficznych *rs12141128* i *rs6680463* w związku z brakiem stosownych informacji w tejże bazie. Na podstawie przeprowadzonej analizy oceny ryzyka zachorowania na raka endometrium w związku z występowaniem polimorfizmów jednonukleotydowych wykazane istotnie statystycznie różnice dotyczyły wyłącznie SNP zlokalizowanych w sekwencjach intronowych genu *TGFBR3*, co może sugerować ich potencjalny wpływ na stabilność, bądź proces składania pierwotnego transkryptu.

Jak wykazano polimorfizmy jednonukleotydowe w genie *TGFBR3*, tj. *rs12566180* (c.-114+2392C>T), *rs6680463* (c.-114+7008C>G) oraz *rs2296621* (c.2285-99G>T) mogą wpływać na zwiększone ryzyko zachorowania na raka endometrium jednocześnie determinując wyższą złośliwość komórek nowotworowych. Zgodnie z aktualną wiedzą brak jest danych literaturowych wskazujących na zaangażowanie polimorfizmu genu kodującego betaglikan w rozwój i progresję nowotworów endometrium. Jedyne dostępne informacje odnoszące się do nowotworzenia dotyczą wpływu polimorfizmów w genie *TGFBR3* na obniżoną ekspresję betaglikanu w pierwotnym i związanym z chronicznym zapaleniem wywołanym wirusem HBV (*ang. hepatitis B virus*) raku wątroby oraz raku jajnika (Bae i wsp., 2009, Charbonneau i wsp., 2014, Kim i wsp., 2011, Xin i wsp., 2012). W pracy Baego i wsp. (2009) analizowano sześć miejsc polimorficznych zlokalizowanych w pięciu eksonach genu *TGFBR3* odpowiednio w 67 preparatach raka wątrobowokomórkowego pochodzących z populacji koreańskiej oraz 10 liniach komórkowych wywodzących się z nowotworów wątroby. Wśród ocenianych SNP znalazły się *rs1805110* (p.Ser15Phe), *rs2810904* (p.Ala72=), *rs2306888* (p.Ser173=), *rs1805113* (p.Phe675=), *rs284878* (p.Thr749=) oraz zidentyfikowany po raz pierwszy polimorfizm p.Thr711=. Jak zaobserwowano jedynie SNP *rs1805110* występował w 98,5% (66/67) przypadków nowotworowych w wariancie polimorficznym, jednakże uzyskanych wyników nie porównywano z materiałem kontrolnym (Bae i wsp., 2009).

Do podobnych wniosków doszła grupa badawcza Xina i wsp. (2012), która poszukiwała korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmów w genach komponentów sygnalizacji komórkowej indukowanej czynnikami TGFβ a zapadalnością na nowotwory wątroby u osób wywodzących się z chińskiej grupy etnicznej Han. Zgodnie z uzyskanymi wynikami spośród 16 polimorfizmów zlokalizowanych w regionach funkcjonalnych genów kodujących izoformę TGFβ1, receptory TGFβR1 oraz TGFβR2, a także betaglikan, tylko polimorfizm *rs1805110* w genie betaglikanu wykazywał istotnie zmienną częstość występowania u osób, u których stwierdzono raka wątrobowokomórkowego, będącego następstwem wirusowego zapalenia wątroby typu B (OR – 1,21; 95%CI 1,01 – 1,46; $p=0,034$) Zmieniony rozkład występowania allelu T miejsca polimorficznego *rs1805110* samodzielnie bądź w kombinacji haplotypów z polimorfizmami *rs2810904*, *rs1805112*, *rs284878* oraz *rs1804506* manifestował się wyłącznie w przypadku mężczyzn. Obserwowane wartości analizy statystycznej dla pojedynczego allelu T wynosiły odpowiednio: OR – 1,33; 95% CI 1,09 – 1,63; $p=0,005$, podczas gdy dla kombinacji haplotypów TCGCA: OR – 1,34; 95%CI 1,02 – 1,76; $p=0,036$ (Xin i wsp., 2012).

Dalsze prace badawcze mające na celu określenie udziału polimorfizmów genu betaglikanu w zachorowalności na raka wątroby indukowanego zakażeniem wirusem HBV wykazały, że dwa polimorfizmy, *rs1805113* (p.Phe675=) oraz *rs1805117* (c.*457A>G) w sposób istotny statystycznie (odpowiednio OR – 0,70; 95%CI 0,54 – 0,92; $p=0,009$ oraz OR – 0,70; 95%CI 0,54 – 0,91; $p=0,008$) wpływają na spontaniczny klirens wirusa HBV w porównaniu do grupy kontrolnej, jednocześnie nie zwiększając *per se* ryzyka zachorowania na raka wątrobowokomórkowego. Dopiero analiza haplotypów wskazała na istnienie związku pomiędzy występowaniem określonej kombinacji wariantów allelicznych a wiekiem zachorowania na ten typ nowotworu (Kim i wsp., 2011).

Z kolei badania genetyczne dotyczące udziału wariantów polimorficznych genów regulujących funkcje limfocytów Treg prowadzone w grupie kobiet ze zdiagnozowanym rakiem jajnika wykazały umiarkowany związek pomiędzy występowaniem dwóch intronowych polimorfizmów *rs12129174* (c.384+1320G>A) (HR – 1,61; 95%CI 1,18 – 2,19; $p=0,0038$) oraz *rs4658265*

(c.247-16378G>A) (HR – 1,56; 95%CI 1,20 – 2,05; p=0,0012) w genie *TGFBR3* a przeżywalnością. Zaobserwowana korelacja dotyczyła jedynie pacjentek, u których stwierdzono występowanie raka jajnika typu śluzowego (Charbonneau i wsp., 2014).

Udział polimorfizmów związanych z genem kodującym betaglikan stwierdza się także w przypadku chorób o podłożu nienowotworowym, w tym m.in. przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, anemii sierpowatej, jaskrze, wadach rozwojowych jąder oraz zespole przedwczesnego wygaszania funkcji jajników (POF, ang. *premature ovarian failure*) (Chand i wsp., 2007, Dalgaard i wsp., 2012, Elliott i wsp., 2007, Flanagan i wsp., 2011, Hersh i wsp., 2009, Li i wsp., 2015). Sugeruje się także ich wpływ na parametry plamki żółtej oraz gęstość mineralną kości (Duncan i wsp., 2011, Khor i wsp., 2011, Xiong i wsp., 2009). Przy czym obserwowane zaburzenia mają zależny od pochodzenia etnicznego charakter.

Nieprawidłowa ekspresja betaglikanu obserwowana nie tylko w raku endometrium, ale również w innych typach nowotworów może skutkować zaburzeniem inicjacji sygnalizacji kanonicznej pochodzącej od izoform czynników TGFβ1/2/3, przy jednoczesnym przeniesieniu jej ciężaru na szlaki niezależne od białek Smad, co w efekcie prowadzi do zniesienia odpowiedzi cytostatycznej, zahamowania apoptozy oraz nasilonej proliferacji komórek. Upośledzenie mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę proliferacji i apoptozy komórek sprzyja tym samym rozwojowi i progresji nowotworowej. Dalsza utrata funkcji kaskady TGFβ towarzysząca procesowi karcynogenezy sprzyja formowaniu się sieci naczyń krwionośnych zaopatrujących komórki nowotworowe w substancje odżywcze i tlen. Jednocześnie dzięki aktywności parakrynej komórki nowotworowe za pośrednictwem sygnalizacji indukowanej transformującymi czynnikami wzrostu typu β stymulują mikrośrodowisko nowotworu do wytwarzania tolerancji immunologicznej komórek układu odpornościowego człowieka na antygeny nowotworowe rozwijającego się guza. Kluczowym czynnikiem warunkującym wysoką śmiertelność z powodu chorób nowotworowych jest zdolność komórek nowotworowych do metastazy, tj. formowania nowych, częstokroć odległych ognisk chorobowych. Jednakże

w tym celu niezbędnych jest wiele procesów nazywanych kaskadą metastatyczną, na którą składają się kolejno nabycie przez komórki nowotworowe zdolności do migracji, pokonanie przez nie bariery błony podstawnej, intrawazacja do światła naczyń krwionośnych i/lub chłonnych, ekstrawazacja ze światła tychże naczyń oraz implantacja komórek nowotworowych i tworzenie ognisk wtórnych, tj. przerzutów.

U podstaw przerzutowania leży biologiczny proces przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT), polegający na reorganizacji struktury tkanki nabłonkowej, w trakcie której nieruchome i spolaryzowane komórki nabłonka ulegają przekształceniu w komórki o fenotypie mezenchymalnym. Procesowi temu towarzyszy apolarność, utrata adhezji komórkowej oraz wzrost zdolności do migracji i inwazji. W komórkach epitelialnych człowieka proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego ma charakter fizjologiczny, odgrywając zasadniczą rolę w trakcie różnicowania się listków zarodkowych podczas embriogenezy, organogenezy i morfogenezy tkanek, ale także pełni kluczową funkcję w utrzymaniu homeostazy tkanek w późniejszych etapach życia. O ile jego aktywacja jest niezbędna podczas gojenia się ran czy procesów zapalnych, w przypadku których po zadziałaniu czynnika inicjującego i spełnieniu swojej funkcji dochodzi do naturalnego zahamowania procesu EMT, o tyle w stanach patologicznych, tj. włóknieniu czy transformacji nowotworowej na skutek nagromadzenia się zmian molekularnych, EMT odpowiada za powolną deregulację i dysfunkcję tkanki, w której nastąpiła jego aktywacja. W trakcie progresji nowotworowej, jak wykazały liczne badania, przemiana nabłonkowo-mezenchymalna odpowiada również za powstawanie lekooporności, czego rezultatem jest przerzutowanie oraz nasilenie się choroby nowotworowej po zastosowaniu standardowych schematów leczenia (Hanahan i Weinberg, 2011; Makker i Goel, 2016; Pieniazek i wsp., 2012; Weinberg, 2008).

Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna jest złożonym procesem wymagającym aktywacji różnorodnych szlaków sygnalizacyjnych oraz współoddziaływania szeregu białek i czynników transkrypcyjnych, w efekcie prowadzących do zmiany profilu markerów komórek nabłonkowych. Po aktywacji przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego w raku endometrium, podobnie jak

w innych typach nowotworów, dochodzi do obniżenia ekspresji białka adhezji komórkowej E-kadheryny, które odpowiada za tworzenie połączeń komórka-komórka. Jak wykazano w przypadku raka endometrium wyższy poziom ekspresji E-kadheryny z jednoczesną ekspresją α oraz β -katenin koreluje z niższym stopniem złośliwości histologicznej komórek nowotworowych G1/2 i wiąże się z lepszą prognozą i przeżywalnością pacjentek (Abal i wsp., 2007; Scholten i wsp., 2006). Ponadto w przypadku nowotworów cechujących się większą złośliwością komórek oraz stopniem zaawansowania choroby nowotworowej, w tym naciekaniem mięśniówki trzonu macicy, stwierdzono zmianę profilu ekspresji kadheryn, z pierwotnego charakterystycznego dla komórek nabłonkowych, w którym dominuje E-kadheryna na profil mezenchymalny o nasilonej ekspresji N-kadheryny oraz wimentyny (Sakuragi i wsp., 1994; Yang i wsp., 2014). Za obserwowaną w raku endometrium zmianę profilu ekspresji kadheryn w znacznej mierze odpowiada czynnik transkrypcyjny Snail pełniący funkcję negatywnego regulatora ekspresji E-kadheryny (Blehschmidt i wsp., 2007). Zgodnie z badaniami Montserrat i wsp. (2011) do nadekspresji czynnika Snail1 dochodzi już na wczesnych etapach nowotworzenia endometrium, co dodatkowo potęgowane jest w późniejszych stadiach zwiększoną ekspresją pozostałych represorów transkrypcji E-kadheryny, tj. białek Twist, ZEB-1, HMGA2 oraz Snail2 (Slug) (Montserrat i wsp., 2012; Tanaka i wsp., 2013). Zmiana ekspresji czynników transkrypcyjnych podczas przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej nie byłaby możliwa bez aktywacji różnorodnych szlaków sygnalizacji komórkowej, a także występującego pomiędzy nimi „cross-talku”. Do głównych ścieżek sygnałowych zaangażowanych w proces EMT w raku endometrium zalicza się szlaki PI3K/Akt, MAPK/Erk, Wnt/ β -katenina, Hedgehog, JAK/STAT, TrkB, Notch oraz sygnalizacja indukowana czynnikami NF κ B (*ang. nuclear factor **kappa B***), HIF (*ang. hypoxia inducible factor*), Eph (*ang. ephrin*), jak również kaskada TGF β (Makker i Goel, 2016).

W raku endometrium indukcja przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego za pośrednictwem szlaku TGF β wiąże się z aktywnością izoform czynnika TGF β . Jak wykazały badania prowadzone na liniach komórkowych HEC-1A oraz RL95-2, służących jako modele badawcze raka endometrium, stymulacja izoformą TGF β 1 przyczyniała się do nabycia przez komórki nowotworowe fenotypu

mezenchymalnego, który cechuje zwiększona inwazyjność oraz zdolność do przerzutowania, co potwierdzono wyraźnym wzrostem poziomu ekspresji jednego z markerów komórek mezenchymalnych, tj. wimentyny. Jednakże wykazany wzrost migracji komórek miał miejsce wyłącznie po uprzedniej stymulacji naskórkowym czynnikiem wzrostu EGF (*ang. epidermal growth factor*), tym samym wskazując, że ekspozycja komórek na izoformę TGFβ1 jest warunkiem *sine qua non* obserwowanego przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego. Potwierdzeniem tego jest analiza bioinformatyczna interakcji gen-gen przeprowadzona na podstawie badań *ex vivo*, w których porównywano profile ekspresji genów nowotworowych endometrium, o niskim (FIGO I) oraz wysokim (FIGO IB, II, III, IV) ryzyku nawrotu choroby nowotworowej. Analiza ta wykazała, że spośród 77 genów, których ekspresja różniła się między porównywanymi grupami, centralne miejsce w sieci interakcji zajmowała izoforma TGFβ1, pomimo braku wyraźnych różnic poziomu jej ekspresji w badanych grupach (Muineloromay i wsp., 2011). Podobny wpływ na aktywację przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego w komórkach raka endometrium wywiera również stymulacja izoformą TGFβ3. Potwierdza to praca opublikowana przez Lei i wsp. (2009), w której zniesienie funkcji receptora TGFβR2, a następnie stymulacja izoformą TGFβ3 komórek linii Hec-1A prowadziła do zahamowania ich inwazyjności i migracji, przy równoczesnej indukcji apoptozy i zachowaniu cech komórek epitelialnych. Obserwowane zahamowanie migracji wiązało się z obniżeniem poziomu fosforylacji białek MAPK/Erk oraz Akt, co sugeruje zaangażowanie niekanonicznej sygnalizacji TGFβ w przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym. Należy również wspomnieć, że w wyniku stymulacji izoformami czynnika TGFβ komórek linii KLE oraz Hec-1A dochodzi także do zwiększonej ekspresji oraz translokacji do jądra komórkowego białka Par-4 (*ang. prostate apoptosis response-4*), co ma miejsce na skutek fosforylacyjnej aktywacji białka Smad2 oraz inhibitora szlaku NFκB, tj. białka IκB (*ang. inhibitor of kappa B*). Białko Par-4, które pierwotnie zostało opisane jako supresor transformacji nowotworowej oraz czynnik proapoptotyczny, w komórkach raka endometrium wydaje się być zaangażowane w aktywację przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej przyczyniając się do zwiększonej ekspresji czynnika transkrypcyjnego Snail oraz wimentyny, zmiany wyglądu morfologicznego komórek nabłonkowych i nasilenia

ich migracji (Chaudhry i wsp., 2014). W obserwowanym wzroście poziomu ekspresji białka Par-4 szczególną rolę wydaje się odgrywać izoforma TGFβ3, która przyczynia się do aktywacji ekspresji markerów procesu EMT, tj. Snail, ZEB-1, N-kadheryny oraz wimentyny, przy jednoczesnym zahamowaniu poziomu E-kadheryny i kładyny-1 (Chaudhry i wsp., 2014).

Indukowana izoformami TGFβ przemiana nabłonkowo-mezenchymalna wydaje się być ponadto wrażliwa na stymulację progesteronem, co dowiedzione zostało przez zespół Bokhari i wsp. (2014) w eksperymentach na liniach komórkowych Hec-1B, RL-95 oraz Ishikawa. Długotrwała stymulacja komórek progesteronem prowadziła do zahamowania ekspresji wszystkich trzech izoform TGFβ, tym samym hamując indukowaną izoformą TGFβ1 nasiloną żywotność i inwazyjność komórek nowotworowych. Powyższe obserwacje zdają się tłumaczyć jedną z przyczyn chorób rozrostowych endometrium, u podstaw których leży niezrównoważona progestagenami ekspozycja błony śluzowej trzonu macicy na estrogeny.

Podsumowując uzyskane wyniki, stwierdzony spadek ekspresji betaglikanu będącego receptorem pomocniczym szlaku sygnalizacyjnego TGFβ w raku endometrium jest następstwem różnorodnych, zróżnicowanych osobniczo mechanizmów molekularnych, a jego biologiczny efekt może być zależny od stanu zaawansowania choroby nowotworowej. Można przypuszczać, że jakiegokolwiek zaburzenia molekularne skutkujące nieprawidłowym prezentowaniem czynników TGFβ ich receptorom mogą nie tylko prowadzić do zniesienia bądź deregulacji sygnalizacji za pośrednictwem szlaku TGFβ, ale również przyczyniać się do zaburzenia równowagi pomiędzy dwiema drogami sygnalizacji TGFβ, tj. kanoniczną i niekanoniczną.

7. Podsumowanie wyników

- ❖ W raku endometrium ma miejsce obniżenie ekspresji betaglikanu zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, które może być efektem:
 - ◆ zmian poziomu metylacji genu *TGFBR3* kodującego betaglikan, przy czym zmiany te mają charakter osobniczy;
 - ◆ zmian poziomu ekspresji i metylacji genu czynnika transkrypcyjnego GATA3 regulującego ekspresję betaglikanu, które wykazują zmienny osobniczo charakter;
 - ◆ utraty heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3*, przy braku związku tego mechanizmu ze stopniem zaawansowania procesu nowotworowego;
 - ◆ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w intronach genu *TGFBR3*, tj. rs12566180 (c.-114+2392C>T), rs6680463 (c.-114+7008C>G), rs2296621 (c.2285-99G>T), mogących mieć znaczenie w procesie składania pierwotnego transkryptu genu *TGFBR3* czy wpływać na jego stabilność.

8. Wnioski

Uzyskane w pracy wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- ❖ Spadek ekspresji betaglikanu w raku endometrium jest następstwem zaburzenia różnych mechanizmów molekularnych, w tym metylacji, utraty heterozygotyczności, polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w genie *TGFBR3* oraz ekspresji i metylacji genu *GATA3*.
- ❖ Molekularne mechanizmy warunkujące obniżenie ekspresji betaglikanu w raku endometrium mają zmienny osobniczo charakter.

9. Streszczenie

Rak endometrium jest jednym z najczęściej diagnozowanych ginekologicznych nowotworów złośliwych na świecie i dotyczy przede wszystkim kobiet w wieku około- i pomenopauzalnym. W populacji polskiej zajmuje on czwartą pozycję pod względem zachorowalności wśród chorób nowotworowych, a liczba jego przypadków uległa podwojeniu w ciągu ostatnich dekad. W związku z postępującym starzeniem się społeczeństwa polskiego, na co wskazują dane statystyczne, w najbliższej przyszłości należy spodziewać się znacznego wzrostu liczby nowych przypadków zachorowań na ten typ nowotworu. Obowiązująca klasyfikacja kliniczno-patologiczna wyróżnia w obrębie nowotworów endometrium dwa typy, tj. raki endometrioidalne oraz nieendometrioidalne. Pierwszy z nich obejmujący przede wszystkim gruczolakoraki endometrium stanowi najliczniejszą grupę pod względem częstości występowania, wynoszącą 75%-85%. Pomimo korzystnego rokowania dla tego typu nowotworu, śmiertelność nim powodowana uzależniona jest od stopnia zaawansowania procesu nowotworowego. W przypadku stadiów zaawansowania FIGO I wynosi ona ok. 20%, podczas gdy w stadium FIGO IV jest to aż ok. 75%. Pomimo postępu w dziedzinie biomedycyny brak jest ciągle dobrze zdefiniowanych markerów molekularnych mogących stanowić uzupełnienie klasycznych metod obrazowania, bądź służących monitorowaniu przebiegu procesu leczenia raka endometrium.

Liczne badania wskazują na kluczowe znaczenie sygnalizacji indukowanej transformującymi czynnikami wzrostu typu β (TGF β) zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologiach człowieka. Kaskada sygnalizacyjna TGF β aktywowana jest przez liczną rodzinę białek o aktywności cytokin, co znajduje odzwierciedlenie w modulacji różnorodnych procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie, ruchliwość, adhezja, angiogeneza, odpowiedź immunologiczna czy apoptoza. W literaturze opisano znaczącą rolę tych czynników w procesie transformacji nowotworowej, gdzie ujawnia się ich pleiotropowy charakter. We wczesnych stadiach karcynogenezy ograniczają one proliferację komórek nowotworowych, podczas gdy w późniejszych etapach przyczyniają się do progresji guza oraz jego przerzutowania. Sygnalizacja za pośrednictwem TGF β możliwa jest dzięki obecności w błonie komórkowej dwóch typów receptorów,

tj. TGF β typu I i TGF β typu II, wykazujących aktywność kinaz serynowo/treoninowych. Ponadto modulacja sygnału w kaskadzie jest regulowana za pośrednictwem receptorów pomocniczych, określanych w literaturze jako receptory TGF β typu III. Funkcją receptorów pomocniczych, do których należy betaglikan, jest prezentowanie czynników TGF β ich receptorom TGF β RI i TGF β RII. Zainicjowany zewnątrzkomórkowo sygnał przekazywany może być do wnętrza komórki na drodze kanonicznej, tj. Smad-zależnej lub w sposób niekanoniczny na skutek interakcji z białkami efektorowymi innych szlaków sygnałowych w komórce.

Celem niniejszej pracy była ocena ekspresji betaglikanu oraz identyfikacja potencjalnych mechanizmów molekularnych mogących wpływać na jej zaburzenie w raku endometrium. Analizie poddano metylację regionu promotorowego genu *TGFBR3*, transkrypcyjną regulację ekspresji betaglikanu przy udziale czynnika GATA3, w tym metylację regionu promotorowego genu *GATA3*, utratę heterozygotyczności (LOH) w *locus* genu kodującego betaglikan oraz polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) w genie *TGFBR3*. W badaniach wykorzystano techniki z zakresu biologii molekularnej i genetyki w tym reakcję PCR w czasie rzeczywistym z użyciem sond fluorescencyjnych TaqMan®, Western blotting, metylospecyficzną reakcję PCR oraz analizę długości fragmentów reakcji PCR przeprowadzoną w automatycznym sekwenatorze DNA. Łącznie przebadano 133 przypadki raka endometrium, 69 preparatów prawidłowego endometrium oraz 248 preparatów krwi obwodowej pochodzących od kobiet, u których niezdiagnozowano choroby nowotworowej. Materiał badawczy otrzymano w ramach współpracy z prof. dr. hab. Andrzejem Semczukiem z II Katedry i Kliniki Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz współpracy prof. dr. hab. Magdaleny Bryś (Katedra Cytobiochemii UŁ) z prof. dr. hab. Andrzejem Bieńkiewiczem oraz dr Katarzyną Wójcik-Krowirandą z Katedry Ginekologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Uzyskane wyniki wskazują na istotne statystycznie obniżenie ekspresji betaglikanu w 100% przypadków raka endometrium w odniesieniu do materiału prawidłowego, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Obserwowany spadek poziomu ekspresji tego receptora pomocniczego szlaku TGF β w raku endometrium

wydaje się mieć związek z występowaniem różnorodnych zdarzeń molekularnych, a ich charakter determinowany jest cechami osobniczymi. Stwierdzono, że obniżenie ekspresji betaglikanu w raku endometrium może być wynikiem zarówno utraty heterozygotyczności w *locus* genu *TGFBR3*, jak i metylacji w regionie jego promotora proksymalnego czy modulowania jego transkrypcji, której pośredniczy czynnik GATA3. Ponadto, w raku endometrium polimorfizm pojedynczych nukleotydów genu *TGFBR3* może mieć także wpływ na składanie i stabilność jego transkryptu.

Postępujący wraz ze stadium zaawansowania procesu nowotworowego endometrium spadek ekspresji betaglikanu może skutkować zmianą funkcji szlaku TGF β z supresorowej na promującą progresję i przerzutowanie nowotworu. Dodatkowo obserwowane zmiany molekularne mogą przyczynić się do zaburzenia sygnalizacji TGF β , zakłócając równowagę pomiędzy sygnalizacją kanoniczną i niekanoniczną.

10. Abstract

Endometrial cancer is one of the leading gynecological malignant tumor occurring in women in their menopausal and postmenopausal age. In Polish population its incidence rate takes the fourth position among other cancer related diseases. The total number of new cases has doubled since the last three decades as it is observed in Poland. Due to the progressive ageing of the Polish society, the substantial increase of endometrial cancer incidence rate in the near future may be expected. The current clinico-pathological classification of endometrial cancer includes two types, i.e., type I – endometrioid and type II nonendometrioid cancers. Endometrial cancer type I is mostly diagnosed as endometrial adenocarcinoma with 75%-85% incidence. Despite favorable prognosis for the patients with endometrial cancer its related morbidity is strongly associated with diagnosed cancer aggressiveness. Thus, in the case of cancers classified as FIGO I stage it is about 20%, whereas in the most advanced stage FIGO IV it reaches even 75%. Regardless the advancement in the current biomedicine, there is still the lack of well-defined molecular marker, which could serve in diagnosis or the evaluation of the effectiveness of anticancer therapy.

Numerous studies indicate the crucial role of the cellular signaling induced by transforming growth factor β type (TGF β) in human both physiological and pathological conditions. TGF β signaling cascade is activated by the diverse set of cytokines what can be observed in modulation of different physiological processes, such as cell proliferation, differentiation, migration, cellular adhesion, angiogenesis, immunological response or apoptosis. According to the literature data TGF β pathway plays a pleiotropic role during neoplastic transformation. In the early stages of carcinogenesis TGF β acts as a suppressor of cancer cell proliferation, whereas in the more advanced stages it promotes tumor progression and metastasis. TGF β signaling requires the activity of two types of serine/threonine transmembrane receptor kinases, i.e., TGF β receptors type I and type II. Moreover, it can be modulated by transmembrane or membrane bound accessory receptors which are termed as TGF β receptors type III. The accessory receptors, which are represented by betaglycan, are responsible for TGF β ligand presentation to the TGF β receptors type I and type II. After extracellular initiation,

induced signal is transmitted to the cytoplasm in either Smad-dependent or Smad-independent route due to the interactions with effector proteins of other signaling pathways.

The aim of the current study was the evaluation of betaglycan expression and the identification of potential molecular mechanisms responsible for its alterations in endometrial cancer. The analysis included methylation of *TGFBR3* promoter region, betaglycan transcriptional regulation mediated by transcription factor GATA3 and methylation of *GATA3* promoter region, loss of heterozygosity (LOH) in *TGFBR3* locus and *TGFB3* polymorphisms. Following molecular and genetic methods, i.e., real-time PCR with fluorescent TaqMan® probes, Western blotting, methylation specific PCR and PCR products length analysis in DNA sequencer were applied in this study. The study group consisted of 133 endometrial cancer samples, 69 normal endometrial tissue samples and 248 peripheral blood samples. Collected tissue samples were obtained due to the collaboration with professor Andrzej Semczuk from IInd Department of Gynecology, Lublin Medical University and due to the collaboration between professor Magdalena Bryś from the University of Lodz with professor Andrzej Bieńkiewicz and doctor Katarzyna Wójcik-Krowiranda from Department of Gynecology, Medical University of Lodz.

Obtained results indicate that betaglycan mRNA and protein expression was significantly downregulated in 100% of studied endometrial cancer samples comparing to the normal tissue. Observed decrease seems to be associated with various molecular mechanisms, and their nature is determined by individual diversity among patients. As it has been shown, the molecular mechanisms responsible for betaglycan loss in endometrial cancer include the loss of heterozygosity in *TGFBR3* gene locus, methylation of *TGFBR3* gene proximal promoter, as well as transcriptional modulation mediated by GATA3 transcription factor. Furthermore, single nucleotide polymorphisms in *TGFBR3* gene may have also potential impact on betaglycan transcript processing and stability in this tumor type.

Betaglycan gradual decrease of expression associated with cancer development can be responsible for the switch of TGFβ cascade function from

tumor suppressive to promoting cancer progression and metastasis. Furthermore, observed molecular changes may certainly deregulate TGF β induced signal transmission resulting in interruption of equilibrium between TGF β canonical and non-canonical pathways.

11. Literatura

- Abal**, M., Llaurodo, M., Doll, A., Monge, M., Colas, E., Gonzalez, M., Rigau, M., Alazzouzi, H., Demajo, S., Castellvi, J., Garcia, A., Cajal, S., Xercavins, J., Vazquez-Levin, M. H., Alameda, F., Gil-Moreno, A., i Reventos, J. (2007). Molecular determinants of invasion in endometrial cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 272-277.
- Akhurst**, R. J. i Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 11, S44-S51.
- Akhurst**, R. J. i Hata, A. (2012). Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 790-811.
- Allison**, P., Espiritu, D., Barnett, J. V., i Camenisch, T. D. (2015). Type III TGFbeta receptor and Src direct hyaluronan-mediated invasive cell motility. *Cell Signal.* 27, 453-459.
- Andres**, J. L., Ronnstrand, L., Cheifetz, S., i Massague, J. (1991). Purification of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteoglycan betaglycan. *J. Biol. Chem.* 266, 23282-23287.
- Andres**, J. L., Stanley, K., Cheifetz, S., i Massague, J. (1989). Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* 109, 3137-3145.
- Annes**, J. P., Munger, J. S., i Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* 116, 217-224.
- Antonsen**, S. L., Hogdall, E., Christensen, I. J., Lydolph, M., Tabor, A., Loft, J. A., Fago-Olsen, C. L., Andersen, E. S., Jochumsen, K., i Hogdall, C. (2013). HE4 and CA125 levels in the preoperative assessment of endometrial cancer patients: a prospective multicenter study (ENDOMET). *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 92, 1313-1322.
- Arribas**, J. i Borroto, A. (2002). Protein ectodomain shedding. *Chem. Rev.* 102, 4627-4638.
- Asch-Kendrick**, R. i Cimino-Mathews, A. (2016). The role of GATA3 in breast carcinomas: a review. *Hum. Pathol.* 48, 37-47.
- Babitt**, J. L., Huang, F. W., Wrighting, D. M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T. A., Campagna, J. A., Chung, R. T., Schneyer, A. L., Woolf, C. J., Andrews, N. C., i Lin, H. Y. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* 38, 531-539.
- Babitt**, J. L., Zhang, Y., Samad, T. A., Xia, Y., Tang, J., Campagna, J. A., Schneyer, A. L., Woolf, C. J., i Lin, H. Y. (2005). Repulsive guidance molecule (RGMA), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 29820-29827.
- Badowska-Kozakiewicz**, A. M. (2012). Wybrane markery nowotworowe w rutynowej diagnostyce raka endometrium i szyjki macicy. *Przegląd Menopauzalny* 11, 168-173.
- Bae**, H. J., Eun, J. W., Noh, J. H., Kim, J. K., Jung, K. H., Xie, H. J., Park, W. S., Lee, J. Y., i Nam, S. W. (2009). Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type III in hepatocellular carcinoma is not directly associated with genetic alterations or loss of heterozygosity. *Oncol. Rep.* 22, 475-480.
- Beining**, R. M., Dennis, L. K., Smith, E. M., i Dokras, A. (2008). Meta-analysis of intrauterine device use and risk of endometrial cancer. *Ann. Epidemiol.* 18, 492-499.
- Beral**, V., Bull, D., i Reeves, G. (2005). Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 365, 1543-1551.

- Bermont**, L., Lamielle, F., Lorchel, F., Fauconnet, S., Esumi, H., Weisz, A., i Adessi, G. L. (2001). Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 363-368.
- Bernabeu**, C., Lopez-Novoa, J. M., i Quintanilla, M. (2009). The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 954-973.
- Bertolino**, P., Deckers, M., Lebrin, F., i ten, D. P. (2005). Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* 128, 585S-590S.
- Bierie**, B. i Moses, H. L. (2006). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 506-520.
- Bilandzic**, M. i Stenvers, K. L. (2011). Betaglycan: a multifunctional accessory. *Mol. Cell Endocrinol.* 339, 180-189.
- Bilandzic**, M., Chu, S., Farnworth, P. G., Harrison, C., Nicholls, P., Wang, Y., Escalona, R. M., Fuller, P. J., Findlay, J. K., i Stenvers, K. L. (2009). Loss of betaglycan contributes to the malignant properties of human granulosa tumor cells. *Mol. Endocrinol.* 23, 539-548.
- Bizet**, A. A., Liu, K., Tran-Khanh, N., Saksena, A., Vorstenbosch, J., Finnson, K. W., Buschmann, M. D., i Philip, A. (2011). The TGF-beta co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF-beta receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 742-753.
- Blair**, C. R., Stone, J. B., i Wells, R. G. (2011). The type III TGF-beta receptor betaglycan transmembrane-cytoplasmic domain fragment is stable after ectodomain cleavage and is a substrate of the intramembrane protease gamma-secretase. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 332-339.
- Blehschmidt**, K., Kremmer, E., Hollweck, R., Mylonas, I., Hofler, H., Kremer, M., i Becker, K. F. (2007). The E-cadherin repressor snail plays a role in tumor progression of endometrioid adenocarcinomas. *Diagn. Mol. Pathol.* 16, 222-228.
- Blobe**, G. C., Liu, X., Fang, S. J., How, T., i Lodish, H. F. (2001). A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *J. Biol. Chem.* 276.
- Bokhari**, A. A., Lee, L. R., Raboteau, D., Hamilton, C. A., Maxwell, G. L., Rodriguez, G. C., i Syed, V. (2014). Progesterone inhibits endometrial cancer invasiveness by inhibiting the TGFbeta pathway. *Cancer Prev. Res. (Phila)* 7, 1045-1055.
- Bokhman**, J. V. (1983). Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 15, 10-17.
- Bonadona**, V., Bonaiti, B., Olschwang, S., Grandjouan, S., Huiart, L., Longy, M., Guimbaud, R., Buecher, B., Bignon, Y. J., Caron, O., Colas, C., Nogues, C., Lejeune-Dumoulin, S., Olivier-Faivre, L., Polycarpe-Osaer, F., Nguyen, T. D., Desseigne, F., Saurin, J. C., Berthet, P., Leroux, D., Duffour, J., Manouvrier, S., Frebourg, T., Sobol, H., Lasset, C., i Bonaiti-Pellie, C. (2011). Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 305, 2304-2310.
- Bray**, F., Ren, J. S., Masuyer, E., i Ferlay, J. (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* 132, 1133-1145.
- Brennan**, D. J., Hackethal, A., Metcalf, A. M., Coward, J., Ferguson, K., Oehler, M. K., Quinn, M. A., Janda, M., Leung, Y., Freemantle, M., Webb, P. M., Spurdle, A. B., i Obermair, A. (2014). Serum HE4 as a prognostic marker in endometrial cancer--a population based study. *Gynecol. Oncol.* 132, 159-165.
- Brinton**, L. A., Felix, A. S., McMeekin, D. S., Creasman, W. T., Sherman, M. E., Mutch, D., Cohn, D. E., Walker, J. L., Moore, R. G., Downs, L. S., Soslow, R. A., i Zaino, R. (2013). Etiologic heterogeneity in

endometrial cancer: evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. *Gynecol. Oncol.* 129, 277-284.

Burke, W. M., Orr, J., Leitao, M., Salom, E., Gehrig, P., Olawaiye, A. B., Brewer, M., Boruta, D., Villella, J., Herzog, T., i Abu, S. F. (2014). Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. *Gynecol. Oncol.* 134, 385-392.

Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., i Thun, M. J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 348, 1625-1638.

Chambers, A. F., Groom, A. C., i MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563-572.

Chand, A. L., Robertson, D. M., Shelling, A. N., i Harrison, C. A. (2007). Mutational analysis of betaglycan/TGF-betaRIII in premature ovarian failure. *Fertil. Steril.* 87, 210-212.

Charbonneau, B., Moysich, K. B., Kalli, K. R., Oberg, A. L., Vierkant, R. A., Fogarty, Z. C., Block, M. S., Maurer, M. J., Goergen, K. M., Fridley, B. L., Cunningham, J. M., Rider, D. N., Preston, C., Hartmann, L. C., Lawrenson, K., Wang, C., Tyrer, J., Song, H., deFazio, A., Johnatty, S. E., Doherty, J. A., Phelan, C. M., Sellers, T. A., Ramirez, S. M., Vitonis, A. F., Terry, K. L., Van Den Berg, D., Pike, M. C., Wu, A. H., Berchuck, A., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S. J., Diergaarde, B., Shen, H., Jensen, A., Menkiszak, J., Cybulski, C., Lubilski, J., Ziogas, A., Rothstein, J. H., McGuire, V., Sieh, W., Lester, J., Walsh, C., Vergote, I., Lambrechts, S., Despierre, E., Garcia-Closas, M., Yang, H., Brinton, L. A., Spiewankiewicz, B., Rzepecka, I. K., Dansonka-Mieszkowska, A., Seibold, P., Rudolph, A., Paddock, L. E., Orlow, I., Lundvall, L., Olson, S. H., Hogdall, C. K., Schwaab, I., du, B. A., Harter, P., Flanagan, J. M., Brown, R., Paul, J., Ekici, A. B., Beckmann, M. W., Hein, A., Eccles, D., Lurie, G., Hays, L. E., Bean, Y. T., Pejovic, T., Goodman, M. T., Campbell, I., Fasching, P. A., Konecny, G., Kaye, S. B., Heitz, F., Hogdall, E., Bandera, E. V., Chang-Claude, J., Kupryjanczyk, J., Wentzensen, N., Lambrechts, D., Karlan, B. Y., Whittemore, A. S., Culver, H. A., Gronwald, J., Levine, D. A., Kjaer, S. K., Menon, U., Schildkraut, J. M., Pearce, C. L., Cramer, D. W., Rossing, M. A., Chenevix-Trench, G., Pharoah, P. D., Gayther, S. A., Ness, R. B., Odunsi, K., Sucheston, L. E., Knutson, K. L., i Goode, E. L. (2014). Large-scale evaluation of common variation in regulatory T cell-related genes and ovarian cancer outcome. *Cancer Immunol. Res.* 2, 332-340.

Chaudhry, P., Fabi, F., Singh, M., Parent, S., Leblanc, V., i Asselin, E. (2014). Prostate apoptosis response-4 mediates TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Death. Dis.* 5, e1044.

Cheifetz, S., Andres, J. L., i Massague, J. (1988a). The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 16984-16991.

Cheifetz, S., Bassols, A., Stanley, K., Ohta, M., Greenberger, J., i Massague, J. (1988b). Heterodimeric transforming growth factor beta. Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors. *J. Biol. Chem.* 263, 10783-10789.

Cheifetz, S., Bellon, T., Cales C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., i Letartell, M. (1992). Endoglin Is a Component of the Transforming Growth Factor- β Receptor System in Human Endothelial Cell. *J. Biol. Chem.* 267, 19027-19030.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., i Wahl, S. M. (2003a). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875-1886.

Chen, W., Kirkbride, K. C., How, T., Nelson, C. D., Mo, J., Frederick, J. P., Wang, X. F., Lefkowitz, R. J., i Blobel, G. C. (2003b). Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301, 1394-1397.

- Cheung**, H. K., Mei, J., i Xu, R. J. (2003). Quantification of soluble betaglycan in porcine milk. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 12 Suppl, S61.
- Chipuk**, J. E., Bhat, M., Hsing, A. Y., Ma, J., i Danielpour, D. (2001). Bcl-xL blocks transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release and not by directly antagonizing Apaf-1-dependent caspase activation in prostate epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 26614-26621.
- Chomczynski**, P. i Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chou**, J., Provot, S., i Werb, Z. (2010). GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it! *J. Cell Physiol* 222, 42-49.
- Chung**, H. H., Kim, J. W., Park, N. H., Song, Y. S., Kang, S. B., i Lee, H. P. (2006). Use of preoperative serum CA-125 levels for prediction of lymph node metastasis and prognosis in endometrial cancer. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 85, 1501-1505.
- Clark**, B. Z., Beriwal, S., Dabbs, D. J., i Bhargava, R. (2014). Semiquantitative GATA-3 immunoreactivity in breast, bladder, gynecologic tract, and other cytokeratin 7-positive carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 142, 64-71.
- Conery**, A. R., Cao, Y., Thompson, E. A., Townsend, C. M., Jr., Ko, T. C., i Luo, K. (2004). Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 6, 366-372.
- Conti**, P., Castellani, M. L., Kempuraj, D., Salini, V., Vecchiet, J., Tete, S., Mastrangelo, F., Perrella, A., De Lutiis, M. A., Tagen, M., i Theoharides, T. C. (2007). Role of mast cells in tumor growth. *Ann. Clin. Lab Sci.* 37, 315-322.
- Cooper**, S. J., Zou, H., LeGrand, S. N., Marlow, L. A., von Roemeling, C. A., Radisky, D. C., Wu, K. J., Hempel, N., Margulis, V., Tun, H. W., Blobe, G. C., Wood, C. G., i Copland, J. A. (2010). Loss of type III transforming growth factor-beta receptor expression is due to methylation silencing of the transcription factor GATA3 in renal cell carcinoma. *Oncogene* 29, 2905-2915.
- Cooper**, S. J., Zou, H., LeGrand, S. N., Marlow, L. A., von Roemeling, C. A., Radisky, D. C., Wu, K. J., Hempel, N., Margulis, V., Tun, H. W., Blobe, G. C., Wood, C. G., i Copland, J. A. (2010). Loss of type III transforming growth factor-beta receptor expression is due to methylation silencing of the transcription factor GATA3 in renal cell carcinoma. *Oncogene* 29, 2905-2915.
- Copland**, J. A., Luxon, B. A., Ajani, L., Maity, T., Campagnaro, E., Guo, H., LeGrand, S. N., Tamboli, P., i Wood, C. G. (2003). Genomic profiling identifies alterations in TGFbeta signaling through loss of TGFbeta receptor expression in human renal cell carcinogenesis and progression. *Oncogene* 22, 8053-8062.
- Craft**, C. S., Romero, D., Vary, C. P., i Bergan, R. C. (2007). Endoglin inhibits prostate cancer motility via activation of the ALK2-Smad1 pathway. *Oncogene* 26, 7240-7250.
- Criswell**, T. L. i Arteaga, C. L. (2007). Modulation of NFkappaB activity and E-cadherin by the type III transforming growth factor beta receptor regulates cell growth and motility. *J. Biol. Chem.* 282, 32491-32500.
- Criswell**, T. L., Dumont, N., Barnett, J. V., i Arteaga, C. L. (2008). Knockdown of the transforming growth factor-beta type III receptor impairs motility and invasion of metastatic cancer cells. *Cancer Res.* 68, 7304-7312.
- Cruz-Merino**, L., Henao-Carrasco, F., Garcia-Manrique, T., Fernandez-Salguero, P. M., i Codes-Manuel, d., V (2009). Role of transforming growth factor beta in cancer microenvironment. *Clin. Transl. Oncol.* 11, 715-720.
- Curtis**, B. R. i McFarland, J. G. (2014). Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang.* 106, 93-102.

- Czabotar**, P. E., Lessene, G., Strasser, A., i Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 49-63.
- Dalgaard**, M. D., Weinhold, N., Edsgard, D., Silver, J. D., Pers, T. H., Nielsen, J. E., Jorgensen, N., Juul, A., Gerds, T. A., Giwercman, A., Giwercman, Y. L., Cohn-Cedermark, G., Virtanen, H. E., Toppari, J., Daugaard, G., Jensen, T. S., Brunak, S., Rajpert-De, M. E., Skakkebaek, N. E., Leffers, H., i Gupta, R. (2012). A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *J. Med. Genet.* 49, 58-65.
- Dallas**, N. A., Samuel, S., Xia, L., Fan, F., Gray, M. J., Lim, S. J., i Ellis, L. M. (2008). Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin. Cancer Res.* 14, 1931-1937.
- Datto**, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., i Wang, X. F. (1995). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5545-5549.
- David**, D., Nair, S. A., i Pillai, M. R. (2013). Smurf E3 ubiquitin ligases at the cross roads of oncogenesis and tumor suppression. *Biochim. Biophys. Acta* 1835, 119-128.
- David**, L., Mallet, C., Vailhe, B., Lamouille, S., Feige, J. J., i Bailly, S. (2007). Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration: potential roles for JNK and ERK. *J. Cell Physiol* 213, 484-489.
- De Caestecker**, M. (2004). The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 1-11.
- De Larco**, J. E. i Todaro, G. J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4001-4005.
- Dennler**, S., Goumans, M. J., i ten Dijke, P. (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* 71, 731-740.
- Denschlag**, D., Tan, L., Patel, S., Kerim-Dikeni, A., Souhami, L., i Gilbert, L. (2007). Stage III endometrial cancer: preoperative predictability, prognostic factors, and treatment outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 546-547.
- Derynck**, R. i Akhurst, R. J. (2007). Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat. Cell Biol.* 9, 1000-1004.
- Derynck**, R. i Miyazono, K. (2008). TGF-beta and the TGF-beta Family., w: The TGF- β - Family., red. Derynck, R., Miyazono, K., p. 29-43. *Cold Spring Harbor Monograph Archive.* 50.
- Derynck**, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assoian, R. K., Roberts, A. B., Sporn, M. B., i Goeddel, D. V. (1985). Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316, 701-705.
- Derynck**, R., Muthusamy, B. P., i Saeteurn, K. Y. (2014). Signaling pathway cooperation in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 31, 56-66.
- Didkowska**, J., i Wojciechowska, U. (2015). Nowotwory złośliwe w Polsce w 2013 roku, Warszawa: Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie.
- Didkowska**, J., Wojciechowska, U., i Zatoński, W. (2009). Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku. Warszawa: Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie.
- Diestel**, U., Resch, M., Meinhardt, K., Weiler, S., Hellmann, T. V., Mueller, T. D., Nickel, J., Eichler, J., i Muller, Y. A. (2013). Identification of a Novel TGF-beta-Binding Site in the Zona Pellucida C-terminal (ZP-C) Domain of TGF-beta-Receptor-3 (TGFR-3). *PLoS. One.* 8, e67214.

- Ding, Z.**, Wu, C. J., Chu, G. C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S. R., Labrot, E. S., Wu, X., Lis, R., Hoshida, Y., Hiller, D., Hu, B., Jiang, S., Zheng, H., Stegh, A. H., Scott, K. L., Signoretti, S., Bardeesy, N., Wang, Y. A., Hill, D. E., Golub, T. R., Stampfer, M. J., Wong, W. H., Loda, M., Mucci, L., Chin, L., i DePinho, R. A. (2011). SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 470, 269-273.
- Dobrzycka, B.**, Mackowiak-Matejczyk, B., Kinalski, M., i Terlikowski, S. J. (2013). Pretreatment serum levels of bFGF and VEGF and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 128, 454-460.
- Dong, M.**, How, T., Kirkbride, K. C., Gordon, K. J., Lee, J. D., Hempel, N., Kelly, P., Moeller, B. J., Marks, J. R., i Blobe, G. C. (2007). The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *J. Clin. Invest* 117, 206-217.
- Dong, M.**, How, T., Kirkbride, K. C., Gordon, K. J., Lee, J. D., Hempel, N., Kelly, P., Moeller, B. J., Marks, J. R., i Blobe, G. C. (2007). The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *J. Clin. Invest* 117, 206-217.
- Drabsch, Y. i ten, D. P.** (2011). TGF-beta signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 16, 97-108.
- Drabsch, Y. i ten, D. P.** (2012). TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 553-568.
- Du, F.**, Yuan, P., Wang, T., Zhao, J., Zhao, Z., Luo, Y., i Xu, B. (2015). The Significance and Therapeutic Potential of GATA3 Expression and Mutation in Breast Cancer: A Systematic Review. *Med. Res. Rev.* 35, 1300-1315.
- Duncan, E. L.**, Danoy, P., Kemp, J. P., Leo, P. J., McCloskey, E., Nicholson, G. C., Eastell, R., Prince, R. L., Eisman, J. A., Jones, G., Sambrook, P. N., Reid, I. R., Dennison, E. M., Wark, J., Richards, J. B., Uitterlinden, A. G., Spector, T. D., Esapa, C., Cox, R. D., Brown, S. D., Thakker, R. V., Addison, K. A., Bradbury, L. A., Center, J. R., Cooper, C., Cremin, C., Estrada, K., Felsenberg, D., Gluer, C. C., Hadler, J., Henry, M. J., Hofman, A., Kotowicz, M. A., Makovey, J., Nguyen, S. C., Nguyen, T. V., Pasco, J. A., Pryce, K., Reid, D. M., Rivadeneira, F., Roux, C., Stefansson, K., Stykarsdottir, U., Thorleifsson, G., Tichawangana, R., Evans, D. M., i Brown, M. A. (2011). Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS. Genet.* 7, e1001372.
- Eccles, S. A. i Welch, D. R.** (2007). Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 369, 1742-1757.
- Edey, K. i Murdoch, J.** (2010). FIGO staging in vulval and endometrial cancer. *The Obstetrician i Gynaecologist* 12, 245-249.
- Eickelberg, O.**, Centrella, M., Reiss, M., Kashgarian, M., i Wells, R. G. (2002). Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J. Biol. Chem.* 277, 823-829.
- Elliott, L.**, Ashley-Koch, A. E., De, C. L., Jonassaint, J., Price, J., Ataga, K. I., Levesque, M. C., Brice, W. J., Eckman, J. R., Orringer, E. P., Vance, J. M., i Telen, M. J. (2007). Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* 137, 262-267.
- Eng, C.** (2003). PTEN: one gene, many syndromes. *Hum. Mutat.* 22, 183-198.
- Engelsen, I. B.**, Stefansson, I. M., Akslen, L. A., i Salvesen, H. B. (2008). GATA3 expression in estrogen receptor alpha-negative endometrial carcinomas identifies aggressive tumors with high proliferation and poor patient survival. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 543-547.

- Esparza-Lopez, J.**, Montiel, J. L., Vilchis-Landeros, M. M., Okadome, T., Miyazono, K., i Lopez-Casillas, F. (2001). Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J. Biol. Chem.* 276, 14588-14596.
- Feng, X. H.**, Lin, X., i Derynck, R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J.* 19, 5178-5193.
- Ferlay, J.**, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, i Bray, F. (2014). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Ferlay, J.**, Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., i Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359-E386.
- Fidler, I. J.** (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453-458.
- Finger, E. C.**, Lee, N. Y., You, H. J., i Blobbe, G. C. (2008a). Endocytosis of the type III transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor through the clathrin-independent/lipid raft pathway regulates TGF-beta signaling and receptor down-regulation. *J. Biol. Chem.* 283, 34808-34818.
- Finger, E. C.**, Turley, R. S., Dong, M., How, T., Fields, T. A., i Blobbe, G. C. (2008b). TbetaRIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 29, 528-535.
- Finger, E. C.**, Turley, R. S., Dong, M., How, T., Fields, T. A., i Blobbe, G. C. (2008). TbetaRIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 29, 528-535.
- Fink, K.** i Boratynski, J. (2012). The role of metalloproteinases in modification of extracellular matrix in invasive tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 66, 609-628.
- Finnson, K. W.**, Tam, B. Y., Liu, K., Marcoux, A., Lepage, P., Roy, S., Bizet, A. A., i Philip, A. (2006). Identification of CD109 as part of the TGF-beta receptor system in human keratinocytes. *FASEB J.* 20, 1525-1527.
- Fisher, B.**, Costantino, J. P., Redmond, C. K., Fisher, E. R., Wickerham, D. L., i Cronin, W. M. (1994). Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 527-537.
- Flanagan, J. M.**, Frohlich, D. M., Howard, T. A., Schultz, W. H., Driscoll, C., Nagasubramanian, R., Mortier, N. A., Kimble, A. C., Aygun, B., Adams, R. J., Helms, R. W., i Ware, R. E. (2011). Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 117, 6681-6684.
- Flavell, R. A.**, Sanjabi, S., Wrzesinski, S. H., i Licona-Limon, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 554-567.
- Fleisch, M. C.**, Maxwell, C. A., i Barcellos-Hoff, M. H. (2006). The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocr. Relat Cancer* 13, 379-400.
- Fleming, N. I.**, Jorissen, R. N., Mouradov, D., Christie, M., Sakthianandeswaren, A., Palmieri, M., Day, F., Li, S., Tsui, C., Lipton, L., Desai, J., Jones, I. T., McLaughlin, S., Ward, R. L., Hawkins, N. J., Ruszkiewicz, A. R., Moore, J., Zhu, H. J., Mariadason, J. M., Burgess, A. W., Busam, D., Zhao, Q., Strausberg, R. L., Gibbs, P., i Sieber, O. M. (2013). SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res.* 73, 725-735.
- Florio, P.**, Ciarmela, P., Reis, F. M., Toti, P., Galleri, L., Santopietro, R., Tiso, E., Tosi, P., i Petraglia, F. (2005). Inhibin alpha-subunit and the inhibin coreceptor betaglycan are downregulated in endometrial carcinoma. *Eur. J. Endocrinol.* 152, 277-284.

- Fonsatti, E., Del, V. L., Altomonte, M., Sigalotti, L., Nicotra, M. R., Coral, S., Natali, P. G., i Maio, M.** (2001). Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J. Cell Physiol* 188, 1-7.
- Francis, J. M., Heyworth, C. M., Spooncer, E., Pierce, A., Dexter, T. M., i Whetton, A. D.** (2000). Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 275, 39137-39145.
- Franzen, P., Heldin, C. H., i Miyazono, K.** (1995). The GS domain of the transforming growth factor-beta type I receptor is important in signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 682-689.
- Fridlender, Z. G. i Albelda, S. M.** (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 33, 949-955.
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., i Albelda, S. M.** (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16, 183-194.
- Fukushima, T., Mashiko, M., Takita, K., Otake, T., Endo, Y., Sekikawa, K., i Takenoshita, S.** (2003). Mutational analysis of TGF-beta type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 genes in colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 22, 315-320.
- Galat, A.** (2011). Common structural traits for cystine knot domain of the TGFbeta superfamily of proteins and three-fingered ectodomain of their cellular receptors. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 3437-3451.
- Gatza, C. E., Holtzhausen, A., Kirkbride, K. C., Morton, A., Gatza, M. L., Datto, M. B., i Blobe, G. C.** (2011). Type III TGF-beta receptor enhances colon cancer cell migration and anchorage-independent growth. *Neoplasia*. 13, 758-770.
- Gatza, C. E., Oh, S. Y., i Blobe, G. C.** (2010). Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cell Signal.* 22, 1163-1174.
- Geiger, T. R. i Peeper, D. S.** (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1796, 293-308.
- Gentry, L. E. i Nash, B. W.** (1990). The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry* 29, 6851-6857.
- Gigante, M., Gesualdo, L., i Ranieri, E.** (2012). TGF-beta: a master switch in tumor immunity. *Curr. Pharm. Des.* 18, 4126-4134.
- Gold, L. I., Saxena, B., Mittal, K. R., Marmor, M., Goswami, S., Nactigal, L., Korc, M., i Demopoulos, R. I.** (1994). Increased expression of transforming growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Res.* 54, 2347-2358.
- Gomis, R. R., Alarcon, C., He, W., Wang, Q., Seoane, J., Lash, A., i Massague, J.** (2006a). A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12747-12752.
- Gomis, R. R., Alarcon, C., Nadal, C., Van, P. C., i Massague, J.** (2006b). C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* 10, 203-214.
- Gong, D., Shi, W., Yi, S. J., Chen, H., Groffen, J., i Heisterkamp, N.** (2012). TGFbeta signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC. Immunol.* 13, 31.
- Gordon, K. J., Dong, M., Chislock, E. M., Fields, T. A., i Blobe, G. C.** (2008). Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness

associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression. *Carcinogenesis* 29, 252-262.

Gorelik, L. i Flavell, R. A. (2000). Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity*. 12, 171-181.

Goumans, M. J., Lebrin, F., i Valdimarsdottir, G. (2003a). Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc. Med.* 13, 301-307.

Goumans, M. J., Liu, Z., i ten, D. P. (2009). TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* 19, 116-127.

Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S., i ten, D. P. (2003b). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol. Cell* 12, 817-828.

Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., i ten, D. P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 21, 1743-1753.

Grady, D., Gebretsadik, T., Kerlikowske, K., Ernster, V., i Petitti, D. (1995). Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet. Gynecol.* 85, 304-313.

Gray, A. M. i Mason, A. J. (1990). Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247, 1328-1330.

Griswold-Prenner, I., Kamibayashi, C., Maruoka, E. M., Mumby, M. C., i Derynck, R. (1998). Physical and functional interactions between type I transforming growth factor beta receptors and Balpha, a WD-40 repeat subunit of phosphatase 2A. *Mol. Cell Biol.* 18, 6595-6604.

Guo, X. i Wang, X. F. (2009). Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res.* 19, 71-88.

Gupta, G. P. i Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.

Hagedorn, H. G., Bachmeier, B. E., i Nerlich, A. G. (2001). Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int. J. Oncol.* 18, 669-681.

Hagimoto, N., Kuwano, K., Inoshima, I., Yoshimi, M., Nakamura, N., Fujita, M., Maeyama, T., i Hara, N. (2002). TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J. Immunol.* 168, 6470-6478.

Hagiwara, S., Murakumo, Y., Mii, S., Shigetomi, T., Yamamoto, N., Furue, H., Ueda, M., i Takahashi, M. (2010). Processing of CD109 by furin and its role in the regulation of TGF-beta signaling. *Oncogene* 29, 2181-2191.

Han, S. U., Kim, H. T., Seong, D. H., Kim, Y. S., Park, Y. S., Bang, Y. J., Yang, H. K., i Kim, S. J. (2004). Loss of the Smad3 expression increases susceptibility to tumorigenicity in human gastric cancer. *Oncogene* 23, 1333-1341.

Hanahan, D. i Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hanahan, D. i Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hannon, G. J. i Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.

Hayashida, K., Bartlett, A. H., Chen Y., i Park, P. W. (2010). Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anat. Rec. (Hoboken).* 293, 925-937

- Hecht**, J. L., Ince, T. A., Baak, J. P., Baker, H. E., Ogden, M. W., i Mutter, G. L. (2005). Prediction of endometrial carcinoma by subjective endometrial intraepithelial neoplasia diagnosis. *Mod. Pathol.* 18, 324-330.
- Heldin**, C. H. i Moustakas, A. (2012). Role of Smads in TGFbeta signaling. *Cell Tissue Res.* 347, 21-36.
- Heldin**, C. H., Landstrom, M., i Moustakas, A. (2009). Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 166-176.
- Heldin**, C. H., Vanlandewijck, M., i Moustakas, A. (2012). Regulation of EMT by TGFbeta in cancer. *FEBS Lett.* 586, 1959-1970.
- Hempel**, N., How, T., Cooper, S. J., Green, T. R., Dong, M., Copland, J. A., Wood, C. G., i Blobe, G. C. (2008). Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta. *Carcinogen.* 29, 905-912.
- Hempel**, N., How, T., Cooper, S. J., Green, T. R., Dong, M., Copland, J. A., Wood, C. G., i Blobe, G. C. (2008). Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta. *Carcinogen.* 29, 905-912.
- Hempel**, N., How, T., Dong, M., Murphy, S. K., Fields, T. A., i Blobe, G. C. (2007). Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion. *Cancer Res.* 67, 5231-5238.
- Hempel**, N., How, T., Dong, M., Murphy, S. K., Fields, T. A., i Blobe, G. C. (2007). Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion. *Cancer Res.* 67, 5231-5238.
- Herman**, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., i Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9821-9826.
- Hersh**, C. P., Hansel, N. N., Barnes, K. C., Lomas, D. A., Pillai, S. G., Coxson, H. O., Mathias, R. A., Rafaels, N. M., Wise, R. A., Connett, J. E., Klanderman, B. J., Jacobson, F. L., Gill, R., Litonjua, A. A., Sparrow, D., Reilly, J. J., i Silverman, E. K. (2009). Transforming growth factor-beta receptor-3 is associated with pulmonary emphysema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 324-331.
- Hill**, C. R., Sanchez, N. S., Love, J. D., Arrieta, J. A., Hong, C. C., Brown, C. B., Austin, A. F., i Barnett, J. V. (2012). BMP2 signals loss of epithelial character in epicardial cells but requires the Type III TGFbeta receptor to promote invasion. *Cell Signal.* 24, 1012-1022.
- Hinkula**, M., Pukkala, E., Kyyronen, P., i Kauppila, A. (2002). Grand multiparity and incidence of endometrial cancer: a population-based study in Finland. *Int. J. Cancer* 98, 912-915.
- Hofmann**, T. G., Stollberg, N., Schmitz, M. L., i Will, H. (2003). HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res.* 63, 8271-8277.
- Holderfield**, M. T. i Hughes, C. C. (2008). Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circ. Res.* 102, 637-652.
- Huang**, T., David, L., Mendoza, V., Yang, Y., Villarreal, M., De, K., Sun, L., Fang, X., Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L., i Hinck, A. P. (2011). TGF-beta signalling is mediated by two autonomously functioning TbetaRI:TbetaRII pairs. *EMBO J.* 30, 1263-1276.
- Hunter**, C. A. i Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* 16, 448-457.
- Huse**, M., Chen, Y. G., Massague, J., i Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96, 425-436.
- Hyytiainen**, M., Penttinen, C., i Keski-Oja, J. (2004). Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 41, 233-264.

- Ikushima, H.** i Miyazono, K. (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 10, 415-424.
- Ikushima, H.** i Miyazono, K. (2012). TGF-beta signal transduction spreading to a wider field: a broad variety of mechanisms for context-dependent effects of TGF-beta. *Cell Tissue Res.* 347, 37-49.
- Ingman, W. V.** i Robertson, S. A. (2002). Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays* 24, 904-914.
- Inman, D.,** Kawana, K., Schust, D., Lininger, R., i Young, S. (2008). Cyclic regulation of T-Bet and GATA-3 in human endometrium. *Reprod. Sci.* 15, 83-90.
- Inman, G. J.** (2011). Switching TGFbeta from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 93-99.
- Inman, G. J.** i Allday, M. J. (2000). Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent. *J. Immunol.* 165, 2500-2510.
- Iolascon, A.,** Giordani, L., Borriello, A., Carbone, R., Izzo, A., Tonini, G. P., Gambini, C., i Della, R. F. (2000). Reduced expression of transforming growth factor-beta receptor type III in high stage neuroblastomas. *Br. J. Cancer* 82, 1171-1176.
- Itoh, S.** i ten, D. P. (2007). Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 176-184.
- Ivanov, I. I.,** McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., i Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Jakowlew, S. B.** (2006). Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 435-457.
- Jang, C. W.,** Chen, C. H., Chen, C. C., Chen, J. Y., Su, Y. H., i Chen, R. H. (2002). TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* 4, 51-58.
- Jelinek, D. F.,** Tschumper, R. C., Stolovitzky, G. A., Iturria, S. J., Tu, Y., Lepre, J., Shah, N., i Kay, N. E. (2003). Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Mol. Cancer Res.* 1, 346-361.
- Jesionek-Kupnicka, D.,** Biełkiewicz, A., i Korczyński, J. (2007). Rak trzonu macicy., w: Onkologia – Podręcznik dla studentów i lekarzy., red. R. Kordek, p. 240-243. Gdańsk: VIA MEDICA.
- Jovine, L.,** Darie, C. C., Litscher, E. S., i Wassarman, P. M. (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 83-114.
- Jovine, L.,** Qi, H., Williams, Z., Litscher, E. S., i Wassarman, P. M. (2004). A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 5922-5927.
- Kamat, A. A.,** Merritt, W. M., Coffey, D., Lin, Y. G., Patel, P. R., Broaddus, R., Nugent, E., Han, L. Y., Landen, C. N., Jr., Spannuth, W. A., Lu, C., Coleman, R. L., Gershenson, D. M., i Sood, A. K. (2007). Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 7487-7495.
- Kamińska, J.** i Kowalska, M. (2011). Diagnostyka markerowa i molekularna., w: Nowotwory trzonu macicy., red. Bidziński, M., p. 81-85. Warszawa: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego.
- Kang, J. S.,** Liu, C., i Derynck, R. (2009). New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol.* 19, 385-394.
- Kang, Y.,** Chen, C. R., i Massague, J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* 11, 915-926.

- Kardassis**, D., Murphy, C., Fotsis, T., Moustakas, A., i Stournaras, C. (2009). Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J.* 276, 2947-2965.
- Kehrl**, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B., i Fauci, A. S. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163, 1037-1050.
- Kenney**, N. J., Adkins, H. B., i Sanicola, M. (2004). Nodal and Cripto-1: embryonic pattern formation genes involved in mammary gland development and tumorigenesis. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 9, 133-144.
- Kerr**, G., Sheldon, H., Chaikuad, A., Alfano, I., von, D. F., Bullock, A. N., i Harris, A. L. (2015). A small molecule targeting ALK1 prevents Notch cooperativity and inhibits functional angiogenesis. *Angiogenesis.* 18, 209-217.
- Keski-Oja**, J., Koli, K., i von, M. H. (2004). TGF-beta activation by traction? *Trends Cell Biol.* 14, 657-659.
- Key**, T. J. i Pike, M. C. (1988). The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *Br. J. Cancer* 57, 205-212.
- Khor**, C. C., Ramdas, W. D., Vithana, E. N., Cornes, B. K., Sim, X., Tay, W. T., Saw, S. M., Zheng, Y., Lavanya, R., Wu, R., Wang, J. J., Mitchell, P., Uitterlinden, A. G., Rivadeneira, F., Teo, Y. Y., Chia, K. S., Seielstad, M., Hibberd, M., Vingerling, J. R., Klaver, C. C., Jansonius, N. M., Tai, E. S., Wong, T. Y., van Duijn, C. M., i Aung, T. (2011). Genome-wide association studies in Asians confirm the involvement of ATOH7 and TGFBR3, and further identify CARD10 as a novel locus influencing optic disc area. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1864-1872.
- Kim**, J. H., Yu, S. J., Park, B. L., Cheong, H. S., Pasaje, C. F., Bae, J. S., Lee, H. S., Shin, H. D., i Kim, Y. J. (2011). TGFBR3 polymorphisms and its haplotypes associated with chronic hepatitis B virus infection and age of hepatocellular carcinoma occurrence. *Dig. Dis.* 29, 278-283.
- Kim**, S. G., Jong, H. S., Kim, T. Y., Lee, J. W., Kim, N. K., Hong, S. H., i Bang, Y. J. (2004). Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 420-434.
- Kim**, S. I., Kwak, J. H., Na, H. J., Kim, J. K., Ding, Y., i Choi, M. E. (2009). Transforming growth factor-beta (TGF-beta1) activates TAK1 via TAB1-mediated autophosphorylation, independent of TGF-beta receptor kinase activity in mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 284, 22285-22296.
- Kirkbride**, K. C., Ray, B. N., i Blobe, G. C. (2005). Cell-surface co-receptors: emerging roles in signaling and human disease. *Trends Biochem. Sci.* 30, 611-621.
- Kirkbride**, K. C., Townsend, T. A., Bruinsma, M. W., Barnett, J. V., i Blobe, G. C. (2008). Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J. Biol. Chem.* 283, 7628-7637.
- Klemba**, A., Kukwa, W., Bartnik, E., Krawczyk, T., Scinska, A., Golik, P., i Czarnecka, A. M. (2008). Molecular biology of endometrial carcinoma. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 62, 420-432.
- Kovacs**, J. J., Hara, M. R., Davenport, C. L., Kim, J., i Lefkowitz, R. J. (2009). Arrestin development: emerging roles for beta-arrestins in developmental signaling pathways. *Dev. Cell* 17, 443-458.
- Krasner**, C. (2009). *Harrison Onkologia*, edited by B. A. Chabner, T. J. Lynch, i D. L. Longo, pp. 362-367. Lublin: Czelej.
- Kryczek**, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T. H., Chang, A., Coukos, G., Liu, R., i Zou, W. (2009a). Phenotype, distribution,

generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114, 1141-1149.

Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., i Zou, W. (2009b). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 114, 357-359.

Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M., i Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 770-774.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lambe, M., Wu, J., Weiderpass, E., i Hsieh, C. C. (1999). Childbearing at older age and endometrial cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control* 10, 43-49.

Lambert, K. E., Huang, H., Mythreye, K., i Blobe, G. C. (2011). The type III transforming growth factor-beta receptor inhibits proliferation, migration, and adhesion in human myeloma cells. *Mol. Biol. Cell* 22, 1463-1472.

Lamouille, S., Mallet, C., Feige, J. J., i Bailly, S. (2002). Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 100, 4495-4501.

Laouar, Y., Sutterwala, F. S., Gorelik, L., i Flavell, R. A. (2005). Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat. Immunol.* 6, 600-607.

Larrivee, B., Prahst, C., Gordon, E., del, T. R., Mathivet, T., Duarte, A., Simons, M., i Eichmann, A. (2012). ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev. Cell* 22, 489-500.

Leavy, O. (2012). Maturation and function of NK cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 150.

Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., i ten, D. P. (2005). TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 65, 599-608.

Lebrin, F., Goumans, M. J., Jonker, L., Carvalho, R. L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H. M., i ten, D. P. (2004). Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 23, 4018-4028.

Lee, J. D., Hempel, N., Lee, N. Y., i Blobe, G. C. (2010). The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression through GIPC-mediated inhibition of TGF-beta signaling. *Carcinogenesis* 31, 175-183.

Lei, X., Wang, L., Yang, J., i Sun, L. Z. (2009). TGFbeta signaling supports survival and metastasis of endometrial cancer cells. *Cancer Manag. Res.* 2009, 15-24.

Lewis, C. E. i Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66, 605-612.

Li, L. C. i Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 18, 1427-1431.

Li, M. O. i Flavell, R. A. (2008). TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134, 392-404.

Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., i Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 99-146.

Li, Q. (2014). Transforming growth factor beta signaling in uterine development and function. *J. Anim Sci. Biotechnol.* 5, 52.

- Li, Z.**, Allingham, R. R., Nakano, M., Jia, L., Chen, Y., Ikeda, Y., Mani, B., Chen, L. J., Kee, C., Garway-Heath, D. F., Sripriya, S., Fuse, N., Abu-Amero, K. K., Huang, C., Namburi, P., Burdon, K., Perera, S. A., Gharahkhani, P., Lin, Y., Ueno, M., Ozaki, M., Mizoguchi, T., Krishnadas, S. R., Osman, E. A., Lee, M. C., Chan, A. S., Tajudin, L. S., Do, T., Goncalves, A., Reynier, P., Zhang, H., Bourne, R., Goh, D., Broadway, D., Husain, R., Negi, A. K., Su, D. H., Ho, C. L., Blanco, A. A., Leung, C. K., Wong, T. T., Yakub, A., Liu, Y., Nongpiur, M. E., Han, J. C., Hon, d. N., Shantha, B., Zhao, B., Sang, J., Zhang, N., Sato, R., Yoshii, K., Panda-Jonas, S., Ashley Koch, A. E., Herndon, L. W., Moroi, S. E., Challa, P., Foo, J. N., Bei, J. X., Zeng, Y. X., Simmons, C. P., Bich Chau, T. N., Sharmila, P. F., Chew, M., Lim, B., Tam, P. O., Chua, E., Ng, X. Y., Yong, V. H., Chong, Y. F., Meah, W. Y., Vijayan, S., Seongsoo, S., Xu, W., Teo, Y. Y., Cooke Bailey, J. N., Kang, J. H., Haines, J. L., Cheng, C. Y., Saw, S. M., Tai, E. S., Richards, J. E., Ritch, R., Gaasterland, D. E., Pasquale, L. R., Liu, J., Jonas, J. B., Milea, D., George, R., Al-Obeidan, S. A., Mori, K., Macgregor, S., Hewitt, A. W., Girkin, C. A., Zhang, M., Sundaresan, P., Vijaya, L., Mackey, D. A., Wong, T. Y., Craig, J. E., Sun, X., Kinoshita, S., Wiggs, J. L., Khor, C. C., Yang, Z., Pang, C. P., Wang, N., Hauser, M. A., Tashiro, K., Aung, T., i Vithana, E. N. (2015). A common variant near TGFBR3 is associated with primary open angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3880-3892.
- Lin, M.**, Sutherland, D. R., Horsfall, W., Totty, N., Yeo, E., Nayar, R., Wu, X. F., i Schuh, A. C. (2002). Cell surface antigen CD109 is a novel member of the alpha(2) macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood* 99, 1683-1691.
- Lin, S. J.**, Hu, Y., Zhu, J., Woodruff, T. K., i Jardetzky, T. S. (2011). Structure of betaglycan zona pellucida (ZP)-C domain provides insights into ZP-mediated protein polymerization and TGF-beta binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5232-5236.
- Lippitz, B. E.** (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 14, e218-e228.
- Liu, F. S.** (2007). Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 46, 26-32.
- Liu, X. L.**, Xiao, K., Xue, B., Yang, D., Lei, Z., Shan, Y., i Zhang, H. T. (2013a). Dual role of TGFBR3 in bladder cancer. *Oncol. Rep.* 30, 1301-1308.
- Liu, X. L.**, Xue, B. X., Lei, Z., Yang, D. R., Zhang, Q. C., Shan, Y. X., i Zhang, H. T. (2013b). TGFBR3 Co-Downregulated With GATA3 Is Associated With Methylation of the GATA3 Gene in Bladder Urothelial Carcinoma. *Anat. Rec. (Hoboken.).* 296, 1717-23.
- Liu, Y.**, Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A. B., Perruche, S., i Chen, W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 9, 632-640.
- Lo, S. S.**, Khoo, U. S., Cheng, D. K., Ng, T. Y., Wong, L. C., i Ngan, H. Y. (1999). Role of serial tumor markers in the surveillance for recurrence in endometrial cancer. *Cancer Detect. Prev.* 23, 397-400.
- Lochen, M. L.** i Lund, E. (1997). Childbearing and mortality from cancer of the corpus uteri. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 76, 373-377.
- Loomans, H. A.** i Andl, C. D. (2014). Intertwining of Activin A and TGFbeta Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion. *Cancers. (Basel)* 7, 70-91.
- Lopez-Casillas, F.**, Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S., i Massague, J. (1991). Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67, 785-795.
- Lopez-Casillas, F.**, Payne, H. M., Andres, J. L., i Massague, J. (1994). Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J. Cell Biol.* 124, 557-568.

- Lowry**, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., i Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Ma**, X., Hui, Y., Lin, L., Wu, Y., Zhang, X., i Liu, P. (2015). Clinical significance of COX-2, GLUT-1 and VEGF expressions in endometrial cancer tissues. *Pak. J. Med. Sci.* 31, 280-284.
- Makanji**, Y., Walton, K. L., Wilce, M. C., Chan, K. L., Robertson, D. M., i Harrison, C. A. (2008). Suppression of inhibin A biological activity by alterations in the binding site for betaglycan. *J. Biol. Chem.* 283, 16743-16751.
- Makker**, A. i Goel, M. M. (2016). Tumor progression, metastasis, and modulators of epithelial-mesenchymal transition in endometrioid endometrial carcinoma: an update. *Endocr. Relat Cancer* 23, R85-R111.
- Marcocoe**, J. P., Lim, J. R., Schaubert, K. L., Fodil-Cornu, N., Matka, M., McCubbrey, A. L., Farr, A. R., Vidal, S. M., i Laouar, Y. (2012). TGF-beta is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat. Immunol.* 13, 843-850.
- Marie**, J. C., Liggitt, D., i Rudensky, A. Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity.* 25, 441-454.
- Massague**, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.
- Massague**, J. i Gomis, R. R. (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 580, 2811-2820.
- Matias-Guiu**, X. i Davidson, B. (2014). Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Arch.* 464, 315-331.
- McCullough**, M. L., Patel, A. V., Patel, R., Rodriguez, C., Feigelson, H. S., Bandera, E. V., Gansler, T., Thun, M. J., i Calle, E. E. (2008). Body mass and endometrial cancer risk by hormone replacement therapy and cancer subtype. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 73-79.
- McLean**, S. i Di Guglielmo, G. M. (2010). TGF beta (transforming growth factor beta) receptor type III directs clathrin-mediated endocytosis of TGF beta receptor types I and II. *Biochem. J.* 429, 137-145.
- Mendoza**, V., Vilchis-Landeros, M. M., Mendoza-Hernandez, G., Huang, T., Villarreal, M. M., Hinck, A. P., Lopez-Casillas, F., i Montiel, J. L. (2009). Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF-beta binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry (USA)* 48, 11755-11765.
- Meyer**, A. E., Gatz, C. E., How, T., Starr, M., Nixon, A. B., i Blobe, G. C. (2014). Role of TGF-beta receptor III localization in polarity and breast cancer progression. *Mol. Biol. Cell* 25, 2291-2304.
- Meyer**, L. A., Broaddus, R. R., i Lu, K. H. (2009). Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations. *Cancer Control* 16, 14-22.
- Mhaweche-Fauceglia**, P., Kesterson, J., Wang, D., Akers, S., Dupont, N. C., Clark, K., Lele, S., i Liu, S. (2011). Expression and clinical significance of the transforming growth factor-beta signalling pathway in endometrial cancer. *Histopathology* 59, 63-72.
- Mills**, K. H. (2008). Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 2636-2649.
- Miyazono**, K., Kamiya, Y., i Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* 147, 35-51.
- Miyazono**, K., Maeda, S., i Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 251-263.

- Mokrosinski, J.** i Krajewska, W. M. (2008). TGF beta signalling accessory receptors. *Postępy Biochem.* 54, 264-273.
- Moldoveanu, T.,** Follis, A. V., Kriwacki, R. W., i Green, D. R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* 39, 101-111.
- Montserrat, N.,** Mozos, A., Llobet, D., Dolcet, X., Pons, C., de Herreros, A. G., Matias-Guiu, X., i Prat, J. (2012). Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Hum. Pathol.* 43, 632-643.
- Moren, A.,** Ichijo, H., i Miyazono, K. (1992). Molecular cloning and characterization of the human and porcine transforming growth factor-beta type III receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 356-362.
- Morrison, C. D.,** Parvani, J. G., i Schiemann, W. P. (2013). The relevance of the TGF-beta Paradox to EMT-MET programs. *Cancer Lett.* 341, 30-40.
- Moses, H. L.** i Roberts (2008). The Discovery of TGF-beta: A Historical Perspective., w: The TGF- β -Family., red. Derynck, R., Miyazono, K., *Cold Spring Harbor Monograph Archive.* 50, 1-28.
- Moses, H. L.,** Branum, E. L., Proper, J. A., i Robinson, R. A. (1981). Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res.* 41, 2842-2848.
- Motyl, T.,** Grzelkowska, K., Zimowska, W., Skierski, J., Wareski, P., Ploszaj, T., i Trzeciak, L. (1998). Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *Eur. J. Cell Biol.* 75, 367-374.
- Moya, I. M.,** Umans, L., Maas, E., Pereira, P. N., Beets, K., Francis, A., Sents, W., Robertson, E. J., Mummery, C. L., Huylebroeck, D., i Zwijsen, A. (2012). Stalk cell phenotype depends on integration of Notch and Smad1/5 signaling cascades. *Dev. Cell* 22, 501-514.
- Mu, Y.,** Gudey, S. K., i Landstrom, M. (2012). Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 347, 11-20.
- Muinelo-Romay, L.,** Colas, E., Barbazan, J., Alonso-Alconada, L., Alonso-Nocelo, M., Bouso, M., Curiel, T., Cueva, J., Anido, U., Forteza, J., Gil-Moreno, A., Reventos, J., Lopez-Lopez, R., i Abal, M. (2011). High-risk endometrial carcinoma profiling identifies TGF-beta1 as a key factor in the initiation of tumor invasion. *Mol. Cancer Ther.* 10, 1357-1366.
- Munger, J. S.** i Sheppard, D. (2011). Cross talk among TGF-beta signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005017.
- Murali, R.,** Soslow, R. A., i Weigelt, B. (2014). Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol.* 15, e268-e278.
- Mutter, G. L.,** Zaino, R. J., Baak, J. P., Bentley, R. C., i Robboy, S. J. (2007). Benign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 26, 103-114.
- Mutz-Dehbalaie, I.,** Egle, D., Fessler, S., Hubalek, M., Fiegl, H., Marth, C., i Widschwendter, A. (2012). HE4 is an independent prognostic marker in endometrial cancer patients. *Gynecol. Oncol.* 126, 186-191.
- Mythreya, K.** i Blobel, G. C. (2009a). Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion. *Cell Signal.* 21, 1548-1558.
- Mythreya, K.** i Blobel, G. C. (2009b). The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated activation of Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 8221-8226.

- Narkiewicz, J.,** Lapinska-Szumczyk, S., Zurawa-Janicka, D., Skorko-Glonek, J., Emerich, J., i Lipinska, B. (2009). Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF-beta1 genes in primary endometrial cancer. *Oncol. Rep.* 21, 1529-1537.
- Neuzillet, C.,** Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., i de, G. A. (2015). Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 147, 22-31.
- Nicklin, J.,** Janda, M., Gebski, V., Jobling, T., Land, R., Manolitsas, T., McCartney, A., Nascimento, M., Perrin, L., Baker, J. F., i Obermair, A. (2012). The utility of serum CA-125 in predicting extra-uterine disease in apparent early-stage endometrial cancer. *Int. J. Cancer* 131, 885-890.
- Novitskiy, S. V.,** Pickup, M. W., Chytil, A., Polosukhina, D., Owens, P., i Moses, H. L. (2012). Deletion of TGF-beta signaling in myeloid cells enhances their anti-tumorigenic properties. *J. Leukoc. Biol.* 92, 641-651.
- Oh, S. P.,** Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten, D. P., Kim, S., i Li, E. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2626-2631.
- Ohgushi, M.,** Kuroki, S., Fukamachi, H., O'Reilly, L. A., Kuida, K., Strasser, A., i Yonehara, S. (2005). Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 25, 10017-10028.
- Okadome, T.,** Yamashita, H., Franzen, P., Moren, A., Heldin, C. H., i Miyazono, K. (1994). Distinct roles of the intracellular domains of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 269, 30753-30756.
- Orlova, V. V.,** Liu, Z., Goumans, M. J., i ten, D. P. (2011). Controlling angiogenesis by two unique TGF-beta type I receptor signaling pathways. *Histol. Histopathol.* 26, 1219-1230.
- Oshimori, N. i** Fuchs, E. (2012). The harmonies played by TGF-beta in stem cell biology. *Cell Stem Cell* 11, 751-764.
- Ota, T.,** Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H., i Miyazono, K. (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell Physiol* 193, 299-318.
- Owings, R. A. i** Quick, C. M. (2014). Endometrial intraepithelial neoplasia. *Arch. Pathol. Lab Med.* 138, 484-491.
- Padua, D. i** Massague, J. (2009). Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.* 19, 89-102.
- Padua, D.,** Zhang, X. H., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W. L., Gomis, R. R., i Massague, J. (2008). TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 133, 66-77.
- Papageorgis, P. i** Stylianopoulos, T. (2015). Role of TGFbeta in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review). *Int. J. Oncol.* 46, 933-943.
- Parekh, T. V.,** Gama, P., Wen, X., Demopoulos, R., Munger, J. S., Carcangiu, M. L., Reiss, M., i Gold, L. I. (2002). Transforming growth factor beta signaling is disabled early in human endometrial carcinogenesis concomitant with loss of growth inhibition. *Cancer Res.* 62, 2778-2790.
- Pecorelli, S.** (2009). Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 105, 103-104.
- Peng, J.,** Tsang, J. Y., Li, D., Niu, N., Ho, D. H., Lau, K. F., Lui, V. C., Lamb, J. R., Chen, Y., i Tam, P. K. (2013). Inhibition of TGF-beta signaling in combination with TLR7 ligation re-programs a tumoricidal phenotype in tumor-associated macrophages. *Cancer Lett.* 331, 239-249.

- Perlman**, R., Schiemann, W. P., Brooks, M. W., Lodish, H. F., i Weinberg, R. A. (2001). TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat. Cell Biol.* 3, 708-714.
- Perrot**, C. Y., Javelaud, D., i Mauviel, A. (2013). Overlapping activities of TGF-beta and Hedgehog signaling in cancer: therapeutic targets for cancer treatment. *Pharmacol. Ther.* 137, 183-199.
- Perrot**, I., Blanchard, D., Freymond, N., Isaac, S., Guibert, B., Pacheco, Y., i Lebecque, S. (2007). Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J. Immunol.* 178, 2763-2769.
- Petritsch**, C., Beug, H., Balmain, A., i Oft, M. (2000). TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev.* 14, 3093-3101.
- Pickup**, M., Novitskiy, S., i Moses, H. L. (2013). The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 13, 788-799.
- Pieniazek**, M., Donizy, P., Zietek, M., Szynglarewicz, B., i Matkowski, R. (2012). The role of TGF-beta-related signal transduction pathways in pathogenesis of epithelial-mesenchymal transition as a key element in cancer development and progression. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 66, 583-591.
- Piestrzeniewicz-Ulanska**, D., Brys, M., Semczuk, A., Jakowicki, J. A., i Krajewska, W. M. (2002). Expression of TGF-beta type I and II receptors in normal and cancerous human endometrium. *Cancer Lett.* 186, 231-239.
- Piestrzeniewicz-Ulanska**, D., Brys, M., Semczuk, A., Jakowicki, J. A., i Krajewska, W. M. (2003). Expression and intracellular localization of Smad proteins in human endometrial cancer. *Oncol. Rep.* 10, 1539-1544.
- Piestrzeniewicz-Ulanska**, D., Brys, M., Semczuk, A., Rechberger, T., Jakowicki, J. A., i Krajewska, W. M. (2004). TGF-beta signaling is disrupted in endometrioid-type endometrial carcinomas. *Gynecol. Oncol.* 95, 173-180.
- Pike**, M. C., Peters, R. K., Cozen, W., Probst-Hensch, N. M., Felix, J. C., Wan, P. C., i Mack, T. M. (1997). Estrogen-progestin replacement therapy and endometrial cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1110-1116.
- Poniatowski**, L. A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., i Szukiewicz, D. (2015). Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators. Inflamm.* 2015, 137823.
- Powell**, J. L., Hill, K. A., Shiro, B. C., Diehl, S. J., i Gajewski, W. H. (2005). Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer. *J. Reprod. Med.* 50, 585-590.
- Principe**, D. R., Doll, J. A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H. G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C., i Grippo, P. J. (2014). TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 106, djt369.
- Qin**, J., Wu, S. P., Creighton, C. J., Dai, F., Xie, X., Cheng, C. M., Frolov, A., Ayala, G., Lin, X., Feng, X. H., Ittmann, M. M., Tsai, S. J., Tsai, M. J., i Tsai, S. Y. (2013). COUP-TFII inhibits TGF-beta-induced growth barrier to promote prostate tumorigenesis. *Nature* 493, 236-240.
- Ragnarsson**, G., Eiriksdottir, G., Johannsdottir, J. T., Jonasson, J. G., Egilsson, V., i Ingvarsson, S. (1999). Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival. *Br. J. Cancer* 79, 1468-1474.
- Rahimi**, R. A. i Leof, E. B. (2007). TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J. Cell Biochem.* 102, 593-608.

- Ramjaun**, A. R., Tomlinson, S., Eddaoudi, A., i Downward, J. (2007). Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis. *Oncogene* 26, 970-981.
- Ranganathan**, P., Agrawal, A., Bhushan, R., Chavalmame, A. K., Kalathur, R. K., Takahashi, T., i Kondaiah, P. (2007). Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: differential regulation in normal and tumour cells. *BMC. Genomics* 8, 98.
- Remy**, I., Montmarquette, A., i Michnick, S. W. (2004). PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat. Cell Biol.* 6, 358-365.
- Renahan**, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F., i Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371, 569-578.
- Rich**, J. N., Zhang, M., Datto, M. B., Bigner, D. D., i Wang, X. F. (1999). Transforming growth factor-beta-mediated p15(INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines. *J. Biol. Chem.* 274, 35053-35058.
- Rifkin**, D. B. (2005). Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J. Biol. Chem.* 280, 7409-7412.
- Roberts**, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M., i Sporn, M. B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 5339-5343.
- Rogalińska**, M. i Kiliańska, Z.M. (2012). Targeting Bcl-2 in CLL. *Curr. Med. Chem.* 19, 5109-5115.
- Roh**, Y. S., Song, J., i Seki, E. (2014). TAK1 regulates hepatic cell survival and carcinogenesis. *J. Gastroenterol.* 49, 185-194.
- Romero**, D., Terzic, A., Conley, B. A., Craft, C. S., Jovanovic, B., Bergan, R. C., i Vary, C. P. (2010). Endoglin phosphorylation by ALK2 contributes to the regulation of prostate cancer cell migration. *Carcinogenesis* 31, 359-366.
- Rosen**, L. S., Gordon, M. S., Robert, F., i Matei, D. E. (2014). Endoglin for targeted cancer treatment. *Curr. Oncol. Rep.* 16, 365.
- Saarelainen**, S. K., Staff, S., Peltonen, N., Lehtimäki, T., Isola, J., Kujala, P. M., Vuento, M. H., i Maenpää, J. U. (2014). Endoglin, VEGF, and its receptors in predicting metastases in endometrial carcinoma. *Tumour. Biol.* 35, 4651-4657.
- Sarma**, M. (2000). GDNF - a stranger in the TGF-β superfamily? *Eur. J. Biochem.* 267, 6968-6971.
- Sakuragi**, N., Nishiya, M., Ikeda, K., Ohkouch, T., Furth, E. E., Hareyama, H., Satoh, C., i Fujimoto, S. (1994). Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion. *Gynecol. Oncol.* 53, 183-189.
- Sakurai**, T. i Kudo, M. (2011). Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology* 81 Suppl 1, 24-29.
- Samad**, T. A., Rebbapragada, A., Bell, E., Zhang, Y., Sidis, Y., Jeong, S. J., Campagna, J. A., Perusini, S., Fabrizio, D. A., Schneyer, A. L., Lin, H. Y., Brivanlou, A. H., Attisano, L., i Woolf, C. J. (2005). DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 14122-14129.
- Sanchez**, N. S., Hill, C. R., Love, J. D., Soslow, J. H., Craig, E., Austin, A. F., Brown, C. B., Czirok, A., Camenisch, T. D., i Barnett, J. V. (2011). The cytoplasmic domain of TGFβR3 through its interaction with the scaffolding protein, GIPC, directs epicardial cell behavior. *Dev. Biol.* 358, 331-343.

- Sanchez-Elsner**, T., Botella, L. M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L., i Bernabeu, C. (2001). Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J. Biol. Chem.* 276, 38527-38535.
- Scandura**, J. M., Boccuni, P., Massague, J., i Nimer, S. D. (2004). Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 15231-15236.
- Scholler**, N. i Urban, N. (2007). CA125 in ovarian cancer. *Biomark. Med.* 1, 513-523.
- Scholten**, A. N., Aliredjo, R., Creutzberg, C. L., i Smit, V. T. (2006). Combined E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin expression is a favorable prognostic factor in endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* 16, 1379-1385.
- Schon**, H. T. i Weiskirchen, R. (2014). Immunomodulatory effects of transforming growth factor-beta in the liver. *Hepatobiliary. Surg. Nutr.* 3, 386-406.
- Schouten**, L. J., Goldbohm, R. A., i van den Brandt, P. A. (2004). Anthropometry, physical activity, and endometrial cancer risk: results from the Netherlands Cohort Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1635-1638.
- Semczuk**, A., Zakrzewski, P. K., Forma, E., Cygankiewicz, A. I., Semczuk-Sikora, A., Brys, M., Rechberger, T., i Krajewska, W. M. (2013). TGFbeta-pathway is down-regulated in a uterine carcinosarcoma: a case study. *Pathol. Res. Pract.* 209, 740-744.
- Sengupta**, S., Peterson, T. R., i Sabatini, D. M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* 40, 310-322.
- Seoane**, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A., i Massague, J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117, 211-223.
- Sflomos**, G., Kostaras, E., Panopoulou, E., Pappas, N., Kyrkou, A., Politou, A. S., Fotsis, T., i Murphy, C. (2011). ERBIN is a new SARA-interacting protein: competition between SARA and SMAD2 and SMAD3 for binding to ERBIN. *J. Cell Sci.* 124, 3209-3222.
- Shai**, A., Segev, Y., i Narod, S. A. (2014). Genetics of endometrial cancer. *Fam. Cancer* 13, 499-505.
- Shao**, E. S., Lin, L., Yao, Y., i Bostrom, K. I. (2009). Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood* 114, 2197-2206.
- Shapiro**, S., Kelly, J. P., Rosenberg, L., Kaufman, D. W., Helmrach, S. P., Rosenshein, N. B., Lewis, J. L., Jr., Knapp, R. C., Stolley, P. D., i Schottenfeld, D. (1985). Risk of localized and widespread endometrial cancer in relation to recent and discontinued use of conjugated estrogens. *N. Engl. J. Med.* 313, 969-972.
- Sharifi**, N., Hurt, E. M., Kawasaki, B. T., i Farrar, W. L. (2007). TGFBR3 loss and consequences in prostate cancer. *Prostate* 67, 301-311.
- Shi**, W., Chang, C., Nie, S., Xie, S., Wan, M., i Cao, X. (2007). Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J. Cell Sci.* 120, 1216-1224.
- Shi**, Y. i Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Shull**, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., i . (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-699.
- Siegel**, P. M. i Massague, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807-821.

- Siegel**, P. M., Shu, W., i Massague, J. (2003). Mad upregulation and Id2 repression accompany transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial cell growth suppression. *J. Biol. Chem.* 278, 35444-35450.
- Soliman**, P. T., Wu, D., Tortolero-Luna, G., Schmeler, K. M., Slomovitz, B. M., Bray, M. S., Gershenson, D. M., i Lu, K. H. (2006). Association between adiponectin, insulin resistance, and endometrial cancer. *Cancer* 106, 2376-2381.
- Solinas**, G., Germano, G., Mantovani, A., i Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 86, 1065-1073.
- Sood**, A. K., Buller, R. E., Burger, R. A., Dawson, J. D., Sorosky, J. I., i Berman, M. (1997). Value of preoperative CA 125 level in the management of uterine cancer and prediction of clinical outcome. *Obstet. Gynecol.* 90, 441-447.
- Sorrentino**, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von, B., V, Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C. H., i Landstrom, M. (2008). The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat. Cell Biol.* 10, 1199-1207.
- Soslow**, R. A., Bissonnette, J. P., Wilton, A., Ferguson, S. E., Alektiar, K. M., Duska, L. R., i Oliva, E. (2007). Clinicopathologic analysis of 187 high-grade endometrial carcinomas of different histologic subtypes: similar outcomes belie distinctive biologic differences. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 979-987.
- Starska**, K. i Brzezińska-Błaszczyk, E. (2010). The role of stromal mast cells in the modification of CD4+CD25+Foxp³ regulatory T cells, Th17 lymphocytes and cytotoxic lymphocytes Tc1 in the development and progression of tumor. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 64, 408-416.
- Steidl**, C., Lee, T., Shah, S. P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S. J., Iqbal, J., Weisenburger, D. D., Bast, M. A., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Rimsza, L. M., Campo, E., Delabie, J., Braziel, R. M., Cook, J. R., Tubbs, R. R., Jaffe, E. S., Lenz, G., Connors, J. M., Staudt, L. M., Chan, W. C., i Gascoyne, R. D. (2010). Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 362, 875-885.
- Stembalska-Kozłowska**, A., Smigiel, R., Schlade-Bartusiak, K., i Sasiadek, M. (2003). Niestabilność genetyczna w nowotworach. II. Niestabilność mikrosatelitarna i utrata heterozygotyczności. *Postępy Biol. Kom.* 30, 635-646.
- Susini**, T., Amunni, G., Molino, C., Carriero, C., Rapi, S., Branconi, F., Marchionni, M., Taddei, G., i Scarselli, G. (2007). Ten-year results of a prospective study on the prognostic role of ploidy in endometrial carcinoma: dNA aneuploidy identifies high-risk cases among the so-called 'low-risk' patients with well and moderately differentiated tumors. *Cancer* 109, 882-890.
- Takaku**, M., Grimm, S. A., i Wade, P. A. (2015). GATA3 in Breast Cancer: Tumor Suppressor or Oncogene? *Gene Expr.* 16, 163-168.
- Talar**, B. i Czyż, M. (2013). TGF-beta signaling pathways in cancers. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 67, 1008-1017.
- Tam**, B. Y., Finnson, K. W., i Philip, A. (2003). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins regulate transforming growth factor-beta signaling in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 49610-49617.
- Tanaka**, H., Shinto, O., Yashiro, M., Yamazoe, S., Iwauchi, T., Muguruma, K., Kubo, N., Ohira, M., i Hirakawa, K. (2010). Transforming growth factor beta signaling inhibitor, SB-431542, induces maturation of dendritic cells and enhances anti-tumor activity. *Oncol. Rep.* 24, 1637-1643.
- Tanaka**, Y., Terai, Y., Kawaguchi, H., Fujiwara, S., Yoo, S., Tsunetoh, S., Takai, M., Kanemura, M., Tanabe, A., i Ohmichi, M. (2013). Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer. *Cancer Biol. Ther.* 14, 13-19.

- Tavassoli**, F. i Devilee, P. (2003). *World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs*. pp. 217-257. Lyon: IARC Press.
- Teicher**, B. A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin. Cancer Res.* 13, 6247-6251.
- ten Dijke**, P. i Arthur, H. M. (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 857-869.
- ten Dijke**, P. i Hill, C. S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* 29, 265-273.
- ten Dijke**, P., Goumans, M. J., i Pardali, E. (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis.* 11, 79-89.
- Tian**, F., Zhou, A. X., Smits, A. M., Larsson, E., Goumans, M. J., Heldin, C. H., Boren, J., i Akyurek, L. M. (2010). Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 283-288.
- Tian**, M., Neil, J. R., i Schiemann, W. P. (2011). Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer. *Cell Signal.* 23, 951-962.
- Tian**, M., Neil, J. R., i Schiemann, W. P. (2011). Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer. *Cell Signal.* 23, 951-962.
- Tindemans**, I., Serafini, N., Di Santo, J. P., i Hendriks, R. W. (2014). GATA-3 function in innate and adaptive immunity. *Immunity.* 41, 191-206.
- Tirado-Rodriguez**, B., Ortega, E., Segura-Medina, P., i Huerta-Yepez, S. (2014). TGF- beta: an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development. *J. Immunol. Res.* 2014, 318481.
- Todorovic**, V., Jurukovski, V., Chen, Y., Fontana, L., Dabovic, B., i Rifkin, D. B. (2005). Latent TGF-beta binding proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 38-41.
- Tone**, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M. L., Greene, M. I., i Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* 9, 194-202.
- Towbin**, H., Staehelin, T., i Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Townsend**, T. A., Robinson, J. Y., How, T., DeLaughter, D. M., Blobe, G. C., i Barnett, J. V. (2012). Endocardial cell epithelial-mesenchymal transformation requires Type III TGFbeta receptor interaction with GIPC. *Cell Signal.* 24, 247-256.
- Travis**, M. A. i Sheppard, D. (2014). TGF-beta activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 51-82.
- Tsukazaki**, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., i Wrana, J. L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779-791.
- Tu**, E., Chia, P. Z., i Chen, W. (2014). TGFbeta in T cell biology and tumor immunity: Angel or devil? *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 423-435.
- Turley**, R. S., Finger, E. C., Hempel, N., How, T., Fields, T. A., i Blobe, G. C. (2007). The type III transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer Res.* 67, 1090-1098.
- Turley**, R. S., Finger, E. C., Hempel, N., How, T., Fields, T. A., i Blobe, G. C. (2007). The type III transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer Res.* 67, 1090-1098.

- Velasco-Loyden**, G., Arribas, J., i Lopez-Casillas, F. (2004). The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J. Biol. Chem.* 279, 7721-7733.
- Vignali**, D. A., Collison, L. W., i Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523-532.
- Vilchis-Landeros**, M. M., Montiel, J. L., Mendoza, V., Mendoza-Hernandez, G., i Lopez-Casillas, F. (2001). Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *Biochem. J.* 355, 215-222.
- Vivier**, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., i Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503-510.
- von Boehmer**, H. i Daniel, C. (2013). Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 51-63.
- von Gruenigen**, V. E., Gil, K. M., Frasure, H. E., Jenison, E. L., i Hopkins, M. P. (2005). The impact of obesity and age on quality of life in gynecologic surgery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193, 1369-1375.
- Voss**, M. A., Ganesan, R., Ludeman, L., McCarthy, K., Gornall, R., Schaller, G., Wei, W., i Sundar, S. (2012). Should grade 3 endometrioid endometrial carcinoma be considered a type 2 cancer-a clinical and pathological evaluation. *Gynecol. Oncol.* 124, 15-20.
- Waite**, K. A. i Eng, C. (2003). From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat. Rev. Genet.* 4, 763-773.
- Wakefield**, L. M. i Hill, C. S. (2013). Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 328-341.
- Waligórska**, M., Kostrzewa, Z., Potyra, M., i Rutkowska, L. (2014). Prognoza ludności na lata 2014-2050, Warszawa: Zakład Wydawnictw Statystycznych.
- Wan**, Y. Y. (2014). GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends Immunol.* 35, 233-242.
- Wang**, W., Zhou, G., Hu, M. C., Yao, Z., i Tan, T. H. (1997). Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J. Biol. Chem.* 272, 22771-22775.
- Watabe**, T., Nishihara, A., Mishima, K., Yamashita, J., Shimizu, K., Miyazawa, K., Nishikawa, S., i Miyazono, K. (2003). TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Biol.* 163, 1303-1311.
- Weinberg**, R. A. (2008). Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis* 29, 1092-1095.
- Wendt**, M. K., Tian, M., i Schiemann, W. P. (2012). Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF-beta-induced EMT during cancer progression. *Cell Tissue Res.* 347, 85-101.
- Werner**, H. M. i Salvesen, H. B. (2014). Current status of molecular biomarkers in endometrial cancer. *Curr. Oncol. Rep.* 16, 403.
- Whiteside**, T. L. (2012). What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin. Cancer Biol.* 22, 327-334.
- Wiater**, E., Harrison, C. A., Lewis, K. A., Gray, P. C., i Vale, W. W. (2006). Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions. *J. Biol. Chem.* 281, 17011-17022.

- Wieser, R., Wrana, J. L., i Massague, J. (1995).** GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J.* 14, 2199-2208.
- Wijayarathna, R. i de Kretser, D. M. (2016).** Activins in reproductive biology and beyond. *Hum. Reprod. Update.* 22, doi: 10.1093/humupd/dmv058.
- Wik, E., Trovik, J., Iversen, O. E., Engelsen, I. B., Stefansson, I. M., Vestrheim, L. C., Haugland, H. K., Akslen, L. A., i Salvesen, H. B. (2009).** Deoxyribonucleic acid ploidy in endometrial carcinoma: a reproducible and valid prognostic marker in a routine diagnostic setting. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 201, 603-607.
- Wild, S., Pierpoint, T., Jacobs, H., i McKeigue, P. (2000).** Long-term consequences of polycystic ovary syndrome: results of a 31 year follow-up study. *Hum. Fertil. (Camb.)* 3, 101-105.
- Wojciechowska, U., Didkowska, J., i Zatoński, W. (2009).** Wskaźniki przeżyć chorych na nowotwory złośliwe w Polsce zdiagnozowanych w latach 2000-2002, Warszawa: Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie.
- Wojciechowska, U., Didkowska, J., i Zatoński, W. (2014).** Nowotwory złośliwe w Polsce w 2012 roku, Warszawa: Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie.
- Wolfrain, L. A., Fernandez, T. M., Mamura, M., Fuller, W. L., Kumar, R., Cole, D. E., Byfield, S., Felici, A., Flanders, K. C., Walz, T. M., Roberts, A. B., Aplan, P. D., Balis, F. M., i Letterio, J. J. (2004).** Loss of Smad3 in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 351, 552-559.
- Wolfrain, L. A., Walz, T. M., James, Z., Fernandez, T., i Letterio, J. J. (2004).** p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF-beta-mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness. *J. Immunol.* 173, 3093-3102.
- Wrzesinski, S. H., Wan, Y. Y., i Flavell, R. A. (2007).** Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 13, 5262-5270.
- Wu, M. Y. i Hill, C. S. (2009).** Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev. Cell* 16, 329-343.
- Wu, X., Ma, J., Han, J. D., Wang, N., i Chen, Y. G. (2006).** Distinct regulation of gene expression in human endothelial cells by TGF-beta and its receptors. *Microvasc. Res.* 71, 12-19.
- Xin, Z., Zhang, W., Xu, A., Zhang, L., Yan, T., Li, Z., Wu, X., Zhu, X., Ma, J., Li, K., Li, H., i Liu, Y. (2012).** Polymorphisms in the potential functional regions of the TGF-beta 1 and TGF-beta receptor genes and disease susceptibility in HBV-related hepatocellular carcinoma patients. *Mol. Carcinog.* 51 Suppl 1, E123-E131.
- Xiong, D. H., Liu, X. G., Guo, Y. F., Tan, L. J., Wang, L., Sha, B. Y., Tang, Z. H., Pan, F., Yang, T. L., Chen, X. D., Lei, S. F., Yerges, L. M., Zhu, X. Z., Wheeler, V. W., Patrick, A. L., Bunker, C. H., Guo, Y., Yan, H., Pei, Y. F., Zhang, Y. P., Levy, S., Papasian, C. J., Xiao, P., Lundberg, Y. W., Recker, R. R., Liu, Y. Z., Liu, Y. J., Zmuda, J. M., i Deng, H. W. (2009).** Genome-wide association and follow-up replication studies identified ADAMTS18 and TGFBR3 as bone mass candidate genes in different ethnic groups. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 388-398.
- Yamashita, M., Fathyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., i Zhang, Y. E. (2008).** TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol. Cell* 31, 918-924.
- Yan, Z., Deng, X., i Friedman, E. (2001).** Oncogenic Ki-ras confers a more aggressive colon cancer phenotype through modification of transforming growth factor-beta receptor III. *J. Biol. Chem.* 276, 1555-1563.
- Yang, L., Pang, Y., i Moses, H. L. (2010).** TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 31, 220-227.

- Yang**, W. N., Ai, Z. H., Wang, J., Xu, Y. L., i Teng, Y. C. (2014). Correlation between the overexpression of epidermal growth factor receptor and mesenchymal makers in endometrial carcinoma. *J. Gynecol. Oncol.* 25, 36-42.
- Yano**, T., Ito, K., Fukamachi, H., Chi, X. Z., Wee, H. J., Inoue, K., Ida, H., Bouillet, P., Strasser, A., Bae, S. C., i Ito, Y. (2006). The RUNX3 tumor suppressor upregulates Bim in gastric epithelial cells undergoing transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 26, 4474-4488.
- You**, H. J., How, T., i Blobe, G. C. (2009). The type III transforming growth factor-beta receptor negatively regulates nuclear factor kappa B signaling through its interaction with beta-arrestin2. *Carcinogenesis* 30, 1281-1287.
- Zakrzewski**, P. K. (2012). Zaburzenia kaskady transformujących czynników wzrostu typu β w wybranych patologiach człowieka. *Folia Medica Lodziensia*, 39, 265-292.
- Zakrzewski**, P. K., Mokrosinski, J., Cygankiewicz, A. I., Semczuk, A., Rechberger, T., Skomra, D., i Krajewska, W. M. (2011). Dysregulation of betaglycan expression in primary human endometrial carcinomas. *Cancer Invest.* 29, 137-144.
- Zannoni**, G. F., Scambia, G., i Gallo, D. (2012). The dualistic model of endometrial cancer: the challenge of classifying grade 3 endometrioid carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 127, 262-263.
- Zannoni**, G. F., Vellone, V. G., Arena, V., Prisco, M. G., Scambia, G., Carbone, A., i Gallo, D. (2010). Does high-grade endometrioid carcinoma (grade 3 FIGO) belong to type I or type II endometrial cancer? A clinical-pathological and immunohistochemical study. *Virchows Arch.* 457, 27-34.
- Zanotti**, L., Bignotti, E., Calza, S., Bandiera, E., Ruggeri, G., Galli, C., Tognon, G., Ragnoli, M., Romani, C., Tassi, R. A., Caimi, L., Odicino, F. E., Sartori, E., Pecorelli, S., i Ravaggi, A. (2012). Human epididymis protein 4 as a serum marker for diagnosis of endometrial carcinoma and prediction of clinical outcome. *Clin. Chem. Lab Med.* 50, 2189-2198.
- Zarzynska**, J. M. (2014). Two faces of TGF-beta1 in breast cancer. *Mediators. Inflamm.* 2014, 141747.
- Zhang**, L., Zhou, F., i ten, D. P. (2013). Signaling interplay between transforming growth factor-beta receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 38, 612-620.
- Zhang**, Q., Yu, N., i Lee, C. (2014a). Mysteries of TGF-beta Paradox in Benign and Malignant Cells. *Front. Oncol.* 4, 94.
- Zhang**, X., Li, Y., Xu, H., i Zhang, Y. W. (2014b). The gamma-secretase complex: from structure to function. *Front. Cell Neurosci.* 8, 427.
- Zhang**, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19, 128-139.
- Zhao**, B. i Chen, Y. G. (2014). Regulation of TGF-beta Signal Transduction. *Scientifica. (Cairo.)* 2014, 874065.
- Zheng**, R. i Blobel, G. A. (2010). GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes Cancer* 1, 1178-1188.
- Zhou**, B., Yang, L., Sun, Q., Cong, R., Gu, H., Tang, N., Zhu, H., i Wang, B. (2008). Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Am. J. Med.* 121, 501-508.
- Zhou**, X. P., Kuismanen, S., Nystrom-Lahti, M., Peltomaki, P., i Eng, C. (2002). Distinct PTEN mutational spectra in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome-related endometrial carcinomas compared to sporadic microsatellite unstable tumors. *Hum. Mol. Genet.* 11, 445-450.

Wykaz publikacji

❖ Prace związane z tematyką rozprawy doktorskiej:

1. **P.K. Zakrzewski**, M. Nowacka-Zawisza, A. Semczuk, T. Rechberger, K. Gałczyński, W.M. Krajewska. Significance of TGFBR3 allelic loss in the deregulation of TGF β signaling in primary human endometrial carcinomas. *Oncology Reports*, 35, 932-938, 2016 (IF – 2.486; MNiSW – 20)
2. Semczuk, **P.K. Zakrzewski**, E. Forma, A.I. Cygankiewicz, A. Semczuk-Sikora, M. Bryś, T. Rechberger, W.M. Krajewska. TGF β -pathway is down-regulated in a uterine carcinosarcoma: A case study. *Pathology – Research and Practice*, 209(11), 740-744, 2013 (IF – 1.213; MNiSW – 20)
3. **P.K. Zakrzewski**; Zaburzenia kaskady transformujących czynników wzrostu typu β w wybranych patologiach człowieka. *Folia Medica Lodziensia*, 39(2), 265-292, 2012 (MNiSW (B) – 1)
4. **P.K. Zakrzewski**, A.I. Cygankiewicz, J. Mokrosiński, M. Nowacka-Zawisza, A. Semczuk, T. Rechberger, W.M. Krajewska. Expression of Endoglin in Primary Endometrial Cancer. *Oncology*, 81 (3-4), 243-250, 2011 (IF – 2,538; MNiSW – 25)
5. **P.K. Zakrzewski**, J. Mokrosinski, A.I. Cygankiewicz, A. Semczuk, T. Rechberger, D. Skomra, W.M. Krajewska. Dysregulation of betaglycan expression in primary human endometrial carcinomas. *Cancer Investigation*, 29 (2), 137-144, 2011 (IF – 2,390; MNiSW – 20)

❖ Pozostałe:

6. A. Głobińska, M. Pawełczyk, A. Piechota-Polańczyk, A. Olszewska-Ziąber, S. Moskwa, A. Mikołajczyk, A. Jabłońska, **P.K. Zakrzewski**, M. Brauncajs, M. Jarzębska, S. Taka, N.G. Papadopoulos, M.L. Kowalski. Impaired virus replication and decreased innate immune responses to viral infections in nasal epithelial cells from patients with allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Immunology*, doi: 10.1111/cei.12869, 2016 (IF – 3.148; MNiSW – 30)
7. J. Fichna, D.P. Poole, N. Veldhuis, S.J. MacEachern, D. Saur, **P.K. Zakrzewski**, A.I. Cygankiewicz, A. Mokrowiecka, E. Małecka-Panas, W.M. Krajewska, W. Liedtke, M.S. Steinhoff, J.P. Timmermans, N.W. Bunnett, K.A. Sharkey, M.A. Storr. Transient receptor potential vanilloid 4 inhibits mouse colonic motility by activating NO-dependent enteric neurotransmission. *Journal of Molecular Medicine*, 93, 1297-1309, 2015 (IF – 5.107; MNiSW – 35)
8. M. Zielińska, C. Chen, A. Mokrowiecka, A.I. Cygankiewicz, **P.K. Zakrzewski**, M. Sałaga, E. Małecka-Panas, P. Wlaź, W.M. Krajewska, J. Fichna. Orally

administered novel cyclic pentapeptide P-317 alleviates symptoms of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67, 244-254, 2015 (IF – 2.264; MNiSW – 25)

9. M. Sałaga, P.R. Polepally, **P.K. Zakrzewski**, A.I. Cygankiewicz, M. Sobczak, R. Kordek, J.K. Zjawiony, W.M. Krajewska, J. Fichna. Novel orally available salvinorin A analog PR-38 protects against experimental colitis and reduces abdominal pain in mice by interaction with opioid and cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 92, 618-626, 2014 (IF – 4.650; MNiSW – 40)

10. M. Sałaga, U. Lewandowska, D. Sosnowska, **P.K. Zakrzewski**, A.I. Cygankiewicz, A. Piechota-Polańczyk, M. Sobczak, P. Mosinska, Chunqiu Chen, W.M. Krajewska, J. Fichna. Polyphenol extract from evening primrose pomace alleviates experimental colitis after intracolonic and oral administration in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387, 1069-1078, 2014 (IF – 2.360; MNiSW – 25)

11. J. Fichna, M. Sobczak, A. Mokrowiecka, A.I. Cygankiewicz, **P.K. Zakrzewski**, N. Cenac, M. Sałaga, J-P. Timmermans, N. Vergnolle, E. Małecka-Panas, W.M. Krajewska, M. Storr. Activation of the endogenous nociceptin system by selective nociceptin receptor agonist SCH 221510 produces antitransit and antinociceptive effect: a novel strategy for treatment of diarrhea-predominant IBS. *Neurogastroenterology and Motility*, 26, 1539-1550, 2014 (IF – 3.424; MNiSW – 30)

12. M. Sobczak, **P.K. Zakrzewski**, A.I. Cygankiewicz, A. Mokrowiecka, C. Chen, M. Sałaga, E. Małecka-Panas, R. Kordek, W.M. Krajewska, J. Fichna. Anti-inflammatory action of a novel orally available peptide 317 in mouse models of inflammatory bowel diseases. *Pharmacological Reports*, 66, 741-750, 2014 (IF – 2,165; MNiSW – 25)

13. M. Sałaga, A. Mokrowiecka, **P.K. Zakrzewski**, A.I. Cygankiewicz, E. Leishman, M. Sobczak, H. Zatorski, E. Małecka-Panas, R. Kordek, M. Storr, W.M. Krajewska, H.B. Bradshaw, J. Fichna. Experimental colitis in mice is attenuated by changes in the levels of endocannabinoid metabolites induced by selective inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(9), 998–1009, 2014 (IF – 3.562; MNiSW – 35)

14. M. Sobczak, A. Mokrowiecka, A.I. Cygankiewicz, **P.K. Zakrzewski**, M. Sałaga, M. Storr, R. Kordek, E. Małecka-Panas, W.M. Krajewska, J. Fichna. Anti-inflammatory and antinociceptive action of an orally-available nociceptin receptor (NOP) agonist SCH 221510 in a mouse model of inflammatory bowel diseases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 348(3), 401-409, 2014 (IF – 3.855; MNiSW – 35)

15. J. Fichna, J.T. Wood, M. Papanastasiou, S.K. Vadivel, P. Oprocha, M. Sałaga, M. Sobczak, A. Mokrowiecka, A.I. Cygankiewicz, **P.K. Zakrzewski**, E. Małecka-

Panas, W.M. Krajewska, P. Kościelniak, A. Makriyannis, M.A. Storr. Endocannabinoid and Cannabinoid-Like Fatty Acid Amide Levels Correlate with Pain-Related Symptoms in Patients with IBS-D and IBS-C: A Pilot Study. *PLoS One*, 8(12), e85073, 2013 (IF – 3.730; MNiSW – 40)

16. J. Fichna, A. Mokrowiecka, A.I. Cygankiewicz, **P.K. Zakrzewski**, E. Małecka-Panas, A. Janecka, W.M. Krajewska, M.A. Storr. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 blockade protects against experimental colitis in mice: A new strategy for inflammatory bowel diseases treatment? *Neurogastroenterology and Motility*, 24 (11), e557-e560, 2012 (IF – 3.414; MNiSW – 30)

sumaryczny IF = 46.306,
sumaryczny IF 5-letni = 47.377,
sumarycznie MNiSW = 435

❖ Doniesienia zjazdowe i prezentacje ustne:

1. **P.K. Zakrzewski**, M. Nowacka-Zawisza, A. Semczuk, T. Rechberger, K. Gałczyński, W.M. Krajewska. Molekularne mechanizmy zaburzenia ekspresji betaglikanu w raku endometrium. XXXII Kongres Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Łódź 2015

2. M. Sobczak, U. Lewandowska, A. Podśędek, A. Cygankiewicz, **P.K. Zakrzewski**, M. Sałaga, R. Kordek, W. Krajewska, J. Fichna. Ekstrakt z czerwonej kapusty jako potencjalny suplement w terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit. XVI Kongres Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Wrocław 2014, *Book of abstracts*; p. 74

3. **P.K. Zakrzewski**, M. Nowacka-Zawisza, A.I. Cygankiewicz, A. Semczuk, T. Rechberger, W.M. Krajewska. Loss of heterozygosity – plausible mechanism underlying betaglycan down-regulation in primary endometrial adenocarcinomas. FEBS EMBO Congress, Paris 2014, *FEBS Journal* 281 Suppl. 1, p. 483

4. M. Włodarczyk, A. Sobolewska, A.I. Cygankiewicz, **P.K. Zakrzewski**, W.M. Krajewska, K. Stec-Michalska, A. Piechota-Polańczyk, J. Fichna, M. Wiśniewska-Jarosińska. Differences in expression of G protein-coupled receptor 55 in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. UEG Week 2014 Vienna 2014, *United European Gastroenterology Journal* 2 Suppl. 1, p. A361

5. **P.K. Zakrzewski**. Plejotropowy efekt TGFβ w transformacji nowotworowej. Konferencja Młodzi Biochemicy o Biologii Nowotworów, Łódź 2013 (**prezentacja ustna**)

6. **P.K. Zakrzewski**, E. Forma, M. Bryś, K. Wójcik-Krowiranda, A. Bieńkiewicz, A. Semczuk, W.M. Krajewska. Betaglycan polymorphisms in endometrial cancer.

48 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń 2013, *Acta Biochimica Polonica* 60 Suppl. 1, p. 114

7. **P.K. Zakrzewski**, E. Forma, A. Parzydło, M. Brys, A. Semczuk, T. Rechberger, W.M. Krajewska. The association of TGFBR3 gene polymorphisms with endometrial cancer. 38th FEBS Congress, St. Petersburg 2013, *FEBS Journal* 280 Suppl. 1, p. 394

8. M. Sobczak, A.I. Cygankiewicz, **P.K. Zakrzewski**, A. Mokrowiecka, N. Cenac, M. Sałaga, J.P. Timmermans, N. Vergnolle, E. Małecka-Panas, W.M. Krajewska, M. Storr, J. Fichna. Activation of nopr by novel orally available agonist SCH221510 as new target in the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. VIIIth Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Lublin 2013 *Book of abstracts* KN-VI

9. **P.K. Zakrzewski**, M. Nowacka-Zawisza, A.I. Cygankiewicz, H. Ponamarczuk, A. Semczuk, T. Rechberger, W.M. Krajewska. Molecular mechanisms involved in loss of betaglycan expression in endometrial cancer. 47 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Poznań 2012, *Acta Biochimica Polonica* 59 Suppl. 3, p. 113

10. J. Fichna, J. Stuart, A.I. Cygankiewicz, **P.K. Zakrzewski**, A. Mokrowiecka, M. Sałaga, A. Janecka, E. Małecka-Panas, H. B. Bradshaw, K. Ahn, M.A. Storr. Inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity by PF-3845 reduces diarrhoea and alleviates abdominal pain in mice. International Neurogastroenterology and Motility Meeting, Bologna 2012, *Neurogastroenterology and Motility* 24 Suppl. 1, p.79

11. **P.K. Zakrzewski**, A.I. Cygankiewicz, J. Mokrosiński, M. Nowacka-Zawisza, A. Semczuk, T. Rechberger, W.M. Krajewska. Endoglin as a potential marker of endometrial cancer progression. Konferencja Polskiego Towarzystwa Farmakologii Klinicznej i Terapii „Badania molekularne w położnictwie i ginekologii – możliwy element strategii klinicznej”, Poznań 2011, *Book of abstracts*; p. 77

12. **P.K. Zakrzewski**, E. Forma, D. Kuc, H. Romanowicz-Makowska, A. Semczuk, T. Rechberger, W.M. Krajewska. TGFβ accessory receptors in cancers of female hormone-dependent tissues – endometrium and breast. XLV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wisła 2010, *Acta Biochimica Polonica* 57 Suppl. 4, p. 76 (**prezentacja ustna**)

13. **P.K. Zakrzewski**, A.I. Cygankiewicz, J. Mokrosiński, A. Semczuk, T. Rechberger, W.M. Krajewska. TGFβ auxiliary receptors in endometrial cancer. XIII Gliwickie Spotkania Naukowe, 2009, *Book of abstracts*; p. 94

14. A.I. Cygankiewicz, J. Mokrosiński, M. Nowacka-Zawisza, **P.K. Zakrzewski**, A. Semczuk, T. Rechberger, W.M. Krajewska. TGFβ accessory receptors – betaglycan and CD109 antigen expression in endometrial cancer. XLIV Zjazd

Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Łódź 2009, *Acta Biochimica Polonica* 56
Suppl. 3, p. 69